

# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

## Přírodovědecká fakulta

### Katedra antropologie a genetiky člověka

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



**Bc. Žaneta Chmelařová**

### **Analýza genetických faktorů vzniku karcinomu prsu**

*Analysis of genetic factors of breast cancer*

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: MUDr. Petra Kleiblová, Ph.D.

Praha, 2018

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

.....

Chmelařová Žaneta

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí mé práce paní MUDr. Petře Kleiblové, Ph.D. Velmi si vážím času a trpělivosti, které mi věnovala při zpracovávání mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem členům laboratoře Biochemie a experimentální onkologie na 1. Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze, jmenovitě pak především Mgr. Petře Zemánkové, Mgr. Marianně Borecké a Mgr. Lence Stolařové. V neposlední řadě děkuji také své rodině za podporu po celou dobu studia, nejen ve věcech studijních.

## Abstrakt

Diplomová práce Analýza genetických faktorů vzniku karcinomu prsu se zabývá současnou závažnou problematikou karcinomu prsu z pohledu genetické predispozice. Karcinom prsu (C50) patří mezi nejčastěji se vyskytující nádory u žen. Každoročně je toto onemocnění diagnostikováno více než 7000 ženám a mortalita v ČR dosahuje téměř 2000 případů. Z celkového počtu pacientů s diagnózou karcinomu prsu je přítomna asi u deseti procent pacientů vrozená mutace v některém z predispozičních genů způsobujících výrazně zvýšené riziko vzniku nádorového onemocnění. Na jejich vzniku se ve více než v polovině případů podílejí zárodečné mutace genů *BRCA1* nebo *BRCA2*, ostatní tvoří řada dalších genů, např. *tp53*, *CDH1*, *PTEN*, *STK11*, *ATM*, *PALB2*, *CHEK2*. Včasná diagnostika a identifikace osob se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu má klíčový význam pro jejich zařazení do preventivních programů. Diplomová práce se tedy zaměřuje na testování genů, které nádorové onemocnění mohou způsobovat.

V práci bylo analyzováno 219 známých a kandidátních predispozičních genů v souboru 263 neselektovaných pacientek s karcinomem prsu pomocí cíleného panelového NGS, platforma Illumina. Vybrané identifikované suspektní varianty byly dále potvrzovány pomocí Sangerova sekvenování. Předmětem práce je také mutační analýza rozšířeného souboru 1033 pacientů s diagnózou C50, pro exony 2, genů *CYP1A2* a *CYP3A5* metodou high resolution melting (HRM).

Přestože byla dle předpokladu záchytnost klinicky relevantních patogenních mutací vyšší v souboru žen splňujících indikační kritéria pro genetické testování nádorové predispozice (21/89; 23,6 %), byla v souboru žen s karcinomem prsu nesplňujících platná indikační kritéria nalezena nezanedbatelná skupina žen (14/174; 8,1 %) u kterých byla potvrzena jednoznačná dědičná příčina jejich onemocnění. Většina poškozujících mutací byla nalezena v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2*, ale také ve středně penetrantních genech *CHEK2*, *PALB2*. Na základě získaných výsledků byly dále vybrány geny vhodné k dalším analýzám, u nichž asociace s hereditárním karcinomem prsu není zcela zřejmá. Pro zpřesnění výsledků bude zapotřebí rozšířit vyšetřovaný soubor. Segregační analýzy z důvodu nedostupnosti dalších nemocných členů rodiny nebyly provedeny. Výsledky HRM analýzy a následné statistické zhodnocení naznačují, že mutace v genu *CYP3A5*

nezvyšuje riziko vzniku karcinomu prsu a naopak má charakter spíše protektivní. Gen *CYP1A2* by na základě provedení Fisherova exaktního testu vyhodnocen jako vhodný kandidátní gen pro asociaci s karcinomem prsu. Obě hypotézy bude ovšem nezbytné ověřit na rozšířeném souboru pacientů a (v případě dostupnosti klinických údajů dalších členů rodiny) provést segregační analýzy.

**Klíčová slova:** karcinom prsu, dědičnost, NGS, mutace genů

## **Abstract:**

The thesis The analysis of genetic factors of breast cancer by NGS deals with the current serious problematics of breast cancer from the perspective of genetic predisposition. Breast cancer is one of the most common tumors in women. Every year more than 7000 women are diagnosed with this disease and the mortality rate in the Czech Republic is nearly 2000 cases. Of the total number of patients diagnosed with breast cancer, approximately ten percent of patients have congenital mutations in one of the predisposing genes that cause a significantly increased risk of developing a cancer. More than half of these mutations occur in germline mutations of the *BRCA1* or *BRCA2* genes, others include a number of other genes, eg *tp53*, *CDH1*, *PTEN*, *STK11*, *ATM*, *PALB2*, *CHEK2*. Early diagnosis and identification of persons with increased risk of developing breast cancer is of key importance for their inclusion in preventive programs. Therefore, the thesis aims to testing genes that can cause a breast cancer.

In the thesis, 219 known and candidate predisposition genes were analyzed in a group of 263 non-selected breast cancer patients using a targeted panel NGS, the Illumina platform. Selected identified suspect variants were further confirmed by Sanger sequencing. The aim of this work was also a mutational analysis of an extended set of 1033 patients with breast cancer for *eCYP1A2* and *CYP3A5* genes, both cases targeted to exon 2 with the High Resolution Melting (HRM) method.

Although there was a higher incidence of clinically relevant pathogenic mutations in the set of women meeting the indication criteria for genetic testing of tumor predisposition (21/89, 23.6%), a non-negligible group of women was found in the group of women with breast cancer not meeting the valid indication criteria (14 / 174, 8.1%) who confirmed a clear inherited cause of their disease. Most damaging mutations were found in the major *BRCA1* and *BRCA2* predisposition genes, but also in the genes with middle penetration, such as *CHEK2*, *PALB2*. Based on the results obtained, genes suitable for further analyzes were also selected for which association with hereditary breast cancer is not quite obvious. In order to refine the results, it will be necessary to extend the investigated file. Due to unavailability of other family members with disease, segregation analyses were not

performed. The results of HRM analysis and subsequent statistical evaluation suggest that mutations in the *CYP3A5* gene do not increase the risk of developing breast cancer and, on the contrary, have a rather protective nature. Based on Fisher's exact assay, the *CYP1A2* gene would be evaluated as a suitable candidate gene for association with breast cancer. However, both hypotheses will need to be verified on an extended set of patients and (if clinical data of other family members are available) to perform segregation analyzes.

**Key words:** breast carcinoma, breast cancer, heredity, NGS, gene mutation

# 1 Obsah

1	Obsah.....	8
2	Úvod .....	11
3	Cíle diplomové práce.....	12
4	Přehled literatury .....	14
4.1	Karcinom prsu .....	15
4.1.1	Sporadická forma karcinomu prsu .....	19
4.1.2	Dědičná forma karcinomu prsu.....	19
4.1.3	Hlavní predispoziční geny vzniku karcinomu prsu .....	21
4.1.3.1	<i>BRCA 1, BRCA2</i> geny .....	22
4.1.3.2	<i>PALB2</i> gen.....	23
4.1.3.3	<i>CHEK2</i> gen.....	24
4.1.3.4	<i>TP53</i> gen.....	25
4.1.3.5	Další geny zapojené do oprav poškození DNA.....	25
4.1.3.6	Další geny asociované s karcinomem prsu.....	26
4.1.4	Geny zapojené do metabolismu estrogenů .....	26
4.2	Genetické testování .....	29
4.2.1	Stávající indikační kritéria ke genetickému testování .....	30
4.2.2	Využití sekvenování nové generace v diagnostice .....	31
4.2.3	Výstupy testování .....	31



5	Materiály a metody .....	32
5.1	Vyšetřovaný soubor .....	32
5.1.1	Odběr a zpracování biologických vzorků .....	35
5.1.2	Měření koncentrace a ověření čistoty DNA .....	35
5.2	NGS analýza.....	36
5.2.1	Panel CZEKANCA .....	37
5.2.2	Pracovní postup přípravy DNA knihovny .....	37
5.2.2.1	Fragmentace DNA .....	38
5.2.2.2	End-repair .....	38
5.2.2.3	A - Tailing .....	39
5.2.2.4	Ligace adaptorů .....	39
5.2.2.5	Výběr fragmentů požadované délky - size selekce .....	40
5.2.2.6	PCR.....	40
5.2.2.7	Hybridizace DNA knihovny se sondami .....	41
5.2.2.8	Amplifikace cílové DNA.....	41
5.2.3	Bioinformatické zpracování získaných dat.....	42
5.2.4	Konfirmace variant .....	43
5.3	HRM analýza zárodečných mutací v genech <i>CYP3A5</i> a <i>CPY1A2</i> .....	44
5.3.1	PCR amplifikace cílových oblastí DNA.....	44
5.3.2	Optimalizace PCR.....	45
5.3.3	HRM analýza .....	46

5.3.4	Konfirmace nalezených variant .....	47
6	Výsledky .....	49
6.1	Analýza genů pomocí NGS .....	49
6.1.1	Nalezené varianty v genech prokazatelně asociovaných s C50 .....	50
6.1.2	Nalezené varianty v genech zvyšujících riziko vzniku C56 .....	53
6.1.3	Analýza dalších kandidátních predispozičních genů .....	55
6.1.4	Obecné charakteristiky vyšetřeného souboru .....	57
6.2	Analýza genů <i>CYP3A5</i> a <i>CYP1A2</i> .....	60
6.2.1	<i>CYP3A5</i> gen .....	60
6.2.2	<i>CYP1A2</i> gen .....	61
7	Diskuze .....	63
7.1	Varianty ve známých predispozičních genech („A“) .....	63
7.2	Varianty v genech zvyšující riziko vzniku C56 („B“) .....	65
7.3	Potenciálně patogenní varianty nalezené v ostatních genech („C“) .....	66
7.4	Varianty nalezené v genech <i>CYP3A5</i> a <i>CYP1A2</i> .....	68
8	Závěr .....	70
9	Seznam zkratk .....	71
10	Seznam použité literatury .....	74
11	Přílohy .....	86

## 2 Úvod

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním v populaci žen v ČR. Především z důvodu rozvinutější zdravotní péče, pravidelných preventivních vyšetření a tedy schopnosti zachycení nádorů v časných stádiích zůstává mortalita u tohoto onemocnění stále stejná, ačkoliv incidence se nadále zvyšuje. Ke zlepšení situace přispěl také program organizovaného screeningu, který byl v ČR zahájen v roce 2002. Každoročně je toto onemocnění diagnostikováno více než 7000 ženám. Mortalita v ČR dosahuje téměř 2000 případů ([www.svod.cz](http://www.svod.cz)).

Z celkového počtu pacientů s diagnózou karcinomu prsu se jedná převážně o formu sporadickou, dědičná složka, podmíněná přítomností vrozené mutace v některém z predispozičních genů způsobujících výrazně zvýšené riziko vzniku nádorového onemocnění proti běžné populaci, je přítomna asi u deseti procent pacientů. Na jejich vzniku se ve více než v polovině případů podílejí zárodečné mutace genů *BRCA1* nebo *BRCA2*, které zvyšují riziko vzniku onemocnění přibližně 8x proti riziku běžné populace (For et al., 2003). Kromě dalších vysoce penetrantních genů predisponujících ke vzniku karcinomu prsu (např. *tp53*, *CDH1*, *PTEN*, *STK11*) jsou klinicky významné i mutace v genech se střední penetrancí (např. *PALB2*, *CHEK2*, *ATM*), které celoživotní kumulativní riziko ve srovnání s neselektovanou populací zvyšují v rozmezí 2-4x (NCCN, 2016).

Genetické testování se v České republice provádí v současné době u pacientů splňujících platná indikační kritéria pro testování genetické predispozice ke vzniku karcinomu prsu, která zahrnují přítomnost onemocnění v rodině a také vybrané individuální charakteristiky (např. atypické histopatologie, časný nástup onemocnění). Včasná diagnostika a identifikace osob se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu má klíčový význam nejen pro pacienty, ale také pro jejich rodinné příslušníky.

### 3 Cíle diplomové práce

Diplomová práce je zaměřena na posouzení přítomnosti genetického rizika vzniku karcinomu prsu v neselektovaném souboru žen s tímto onemocněním, tedy bez ohledu na jejich věk, histologický typ karcinomu, přítomnost dalších nádorových onemocnění u vyšetřovaných jedinců a v jejich rodinách.

Cílem diplomové práce je i) identifikace patogenních mutací v genech predisponujících ke vzniku ca prsu a vyhodnocení klinických a histopatologických charakteristik u jejich nosiček tak, aby bylo možno tyto informace použít pro následné zhodnocení stávajících kritérií ke genetickému testování a ii) analýza výskytu vybraných kandidátních variant v genech zapojených do metabolismu estrogenů na rozšířeném souboru neselektovaných pacientek s karcinomem prsu a kontrolní populaci.

Náplní bude zejména:

- Analýza predispozičních genů v souboru neselektovaných pacientek s karcinomem prsu pomocí cíleného panelového NGS (platforma Illumina).
- Konfirmace patogenních variant pomocí PCR a Sangerova sekvenování (BDT v3.1, ABI 3130).
- Porovnání frekvence potenciálně patogenních variant s veřejně dostupnými databázemi (zejm. databáze 1000genomes a ESP6500) a s výsledky analýz kontrolní populace dostupných ČR.
- *In silico* predikce potenciální patogenity nalezených variant s dosud neurčeným klinickým významem.
- Posouzení potenciální patogenity kandidátních variant na základě dostupných klinických databází (ClinVar, HGMD, LOVD).
- Provedení segregační analýzy u vybraných patogenních / potenciálně patogenních raritních variant (pokud budou dostupní další nemocní členové rodiny), identifikace nemocných se zřejmou genetickou složkou nádorového onemocnění, a jejich

zařazení do adekvátních preventivních programů (sekundární prevence pro nosiče patogenních mutací).

- HRM analýza vybraných oblastí genů *CYP1A2* a *CYP3A5*, potvrzení aberantních nálezů Sangerovým sekvenováním a porovnání frekvence jejich výskytu v testovaném souboru a dostupných kontrolních souborech.

## 4 Přehled literatury

Maligní nádory („rakovina“) byly přítomny již před miliony let, např. ve zbytcích kostí dinosaura byly objeveny změny související s nádorovým procesem. Také v nejstarších dochovaných písemných dokladech lidstva jsou zhoubné nádory v některých případech brány jako příčina smrti. Název nemoci je odvozen od raka nebo kraba (řecky karkinos = rak nebo onkos = krab, latinsky cancer = rak). Vysvětlení tohoto pojmenování vyplývá z popisu šíření nádorů, které svými dlouhými výběžky podobajícími se račím nohám pronikají do zdravých tkání. Z řeckého jazyka je odvozen také termín onkologie označující vědecký a medicínský obor zabývající se nádorovým onemocněním.

Nádorové buňky se v důsledku patologických změn v DNA vymykají regulačním mechanismům, vyznačují se abnormální klonální proliferací buněk, která není v koordinaci s růstem okolních tkání a rovnováhou organismu. V současné době se předpokládá, že všechny buňky nádoru mají monoklonální původ – tedy že jsou odvozeny od jedné transformované buňky a rozdílnost mezi jednotlivými nádorovými buňkami vzniká v průběhu vývoje nádoru – jedná se tedy o subklony. (Chirurgická onkologie, 2014).

Dle Hanahana a Weinberga jsou maligní nádorové buňky charakterizovány šesti znaky: a) jsou soběstačné v produkci růstových faktorů, b) jsou necitlivé k faktorům zastavujícím buněčný cyklus, c) mají poškozenou apoptózu, d) mají neomezený replikační potenciál, e) nádory mají schopnost angiogeneze, f) nádory mají schopnost invaze a metastazování (Hanahan and Weinberg, 2011). V buňce musí proběhnout těchto šest základních změn, které se podílejí na vytvoření maligního fenotypu. Pro většinu nádorových buněk je charakteristická ještě genetická nestabilita, která je považována za jejich sedmý typický znak. (Chirurgická onkologie, 2014).

Maligní transformace je způsobena postupnou celoživotní akumulací získaných mutací a také epigenetických změn, které ovlivňují buňky tkání a jejich progenitory.

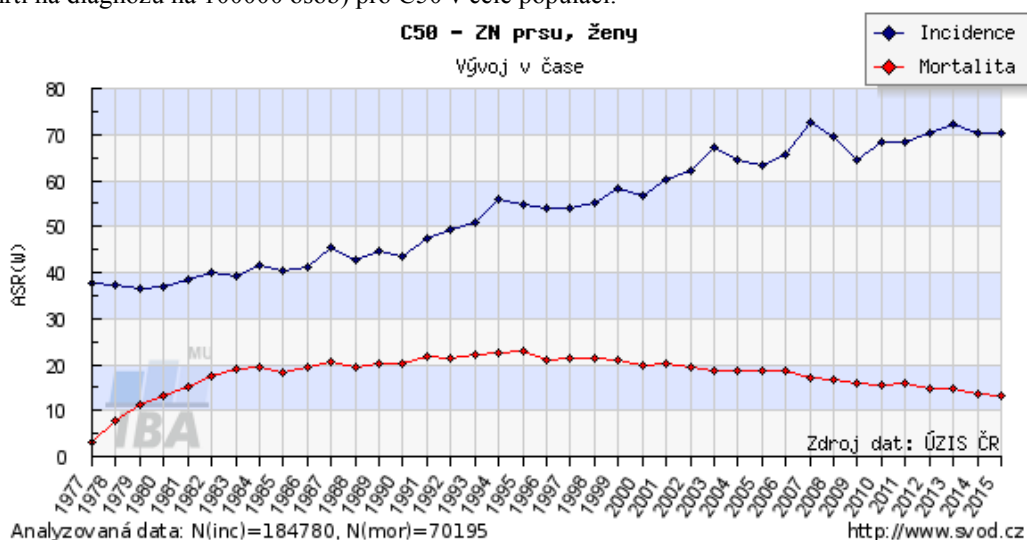
Tyto mutace jsou často přítomny v genech, jež kódují proteiny pro udržení fyziologické homeostázy. Nejčastější příčinou transformace zdravé buňky na nádorovou je nadměrná aktivace buněčného cyklu a omezení apoptózy. Transformace je ještě urychlena, pokud jsou v buňkách poškozené mechanismy oprav DNA.

Riziko vzniku karcinomu ovlivňují nejrozličnější environmentální faktory, ale také jsou známy určité faktory genetické.

## 4.1 Karcinom prsu

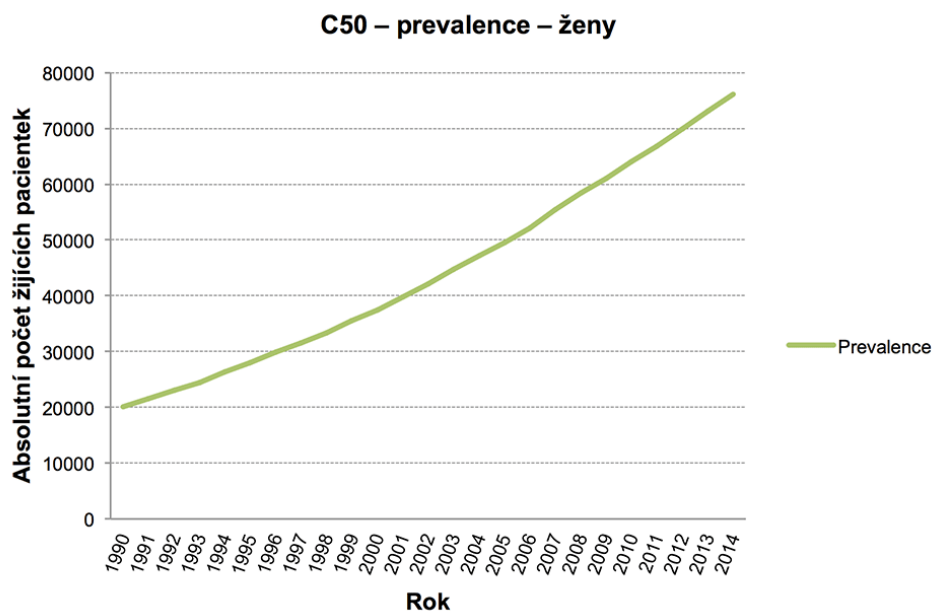
Karcinom prsu je zhoubné nádorové onemocnění, které vzniká maligní transformací epiteliálních buněk prsní žlázy. Celosvětově i v populaci ČR patří karcinom prsu mezi nejčastější zhoubná nádorová onemocnění. Dle dostupných statistických údajů se epidemiologie tohoto onemocnění vyznačuje trvale se zvyšující incidencí a neměnicí se mortalitou. Dle posledních dostupných údajů bylo v roce 2015 hlášeno 7102 nových onemocnění karcinomem prsu (www.svod.cz). Přibližně od poloviny 90. let lze pozorovat postupné zlepšování epidemiologické situace, především stabilizaci a dokonce mírný pokles mortality (Obr. 1).

**Obrázek 1** Vývoj hrubé incidence v čase (počet nových případů na 100000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100000 osob) pro C50 v celé populaci.



Při stále rostoucí incidenci onemocnění a současně zlepšeném přežití nemocných je však nevyhnutelným důsledkem zvyšování prevalence, tedy počtu žijících žen, u kterých byl v minulosti diagnostikován a léčen karcinom prsu. V roce 2014 dosáhla prevalence hodnoty 76 047 žen a ve srovnání s rokem 2004 (47 210 žen) tak vzrostla o 61 % (www.mamo.cz, Obr. 2).

**Obrázek 2** Prevalence karcinomu prsu (C50) u žen v ČR

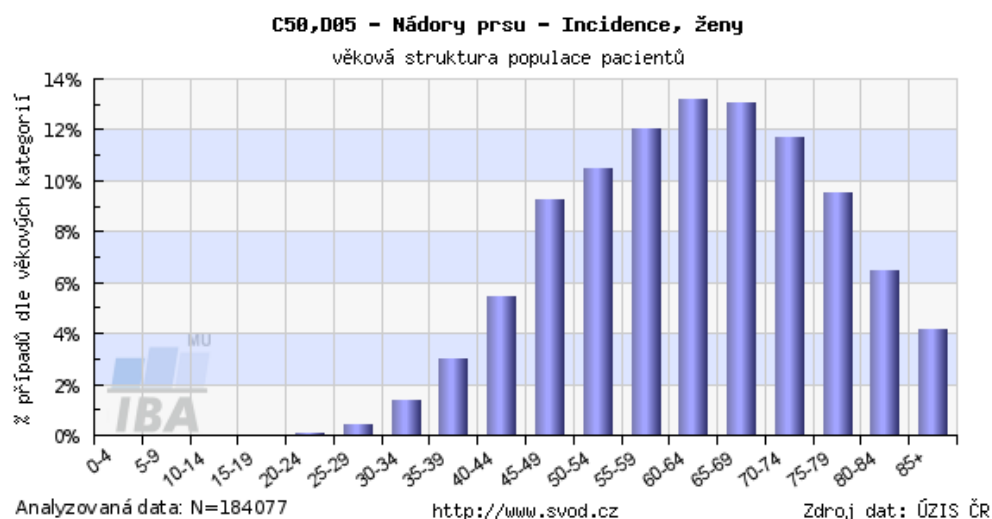


Jako hlavní příčiny celosvětového zvyšování výskytu karcinomu prsu jsou považovány zlepšení mamografického screeningu, v minulých letech nadužívání hormonální substituční terapie a ve vyspělých zemích současný trend prodloužení intervalu mezi menarche a prvním donošeným těhotenstvím (Chirurgická onkologie, 2014).

Dle dostupných údajů Institutu biostatistiky a analýz v Brně bylo hlášeno 76 187 pacientek s diagnózou karcinomu prsu do 60 let (41,3 %). Nad 60 let poté v absolutních počtech 108 593 případů. Největší procento případů tvoří ženy ve věkovém rozmezí 60-69 let, ovšem ženy v produktivním věku jsou také ohroženou skupinou (Obr. 3).

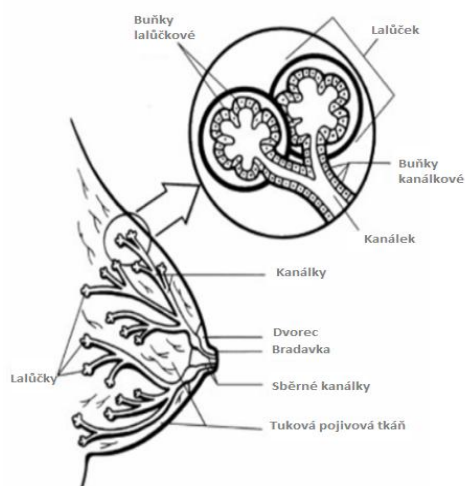


**Obrázek 3** Věková struktura pacientek s C50 v ČR v době diagnózy onemocnění



Z hlediska invazivity můžeme karcinom prsu členit na neinvazivní (*in situ*) karcinomy, které nemají schopnost prorůstání z původní tkáně do okolí a netvoří metastázy, zatímco invazivní karcinom prsu je skupinou maligních epiteliálních nádorů charakterizovaných častou invazivitou do sousedních tkání a častou tendencí k metastazování do vzdálených míst organismu. Nejčastěji vzniká karcinom v buňkách prsních kanálků (duktální karcinom), druhým nejčastějším místem vzniku jsou buňky prsních lalůčků (lobuly) a malé množství karcinomu vzniká také v jiných tkáních (Sharma et al., 2010). Nejčastější histologické typy karcinomu prsu a jejich základní charakteristiky jsou pro přehled uvedeny v Tab. 1.

**Obrázek 4** Struktura prsu převzato a upraveno z (Sharma et al., 2010).



<b>Tabulka 1</b> Histologické typy karcinomu prsu (převzato a upraveno z (Sharma et al., 2010).	
<b>Typ karcinomu</b>	<b>Charakteristika</b>
<b>Lobulární karcinom <i>in situ</i> (LCIS)</b>	Vzniklý v lobulech, nešířící se z místa vzniku
<b>Duktální karcinom <i>in situ</i> (DCIS)</b>	Vzniklý v duktech, nešířící se z místa vzniku, nejčastější neinvazivní karcinom
<b>Lobulární karcinom infiltrující (ILC)</b>	Vzniká v lobulech, metastázuje do jiných částí těla
<b>Duktální karcinom infiltrující (IDC)</b>	Vzniká v duktech, proniká jejich stěnou, invaduje tukovou tkáň prsu a jiné části těla. Nejčastější invazivní karcinom prsu
<b>Medulární karcinom</b>	Tvoří jasnou hranici mezi nádorovou a nenádorovou tkání
<b>Mucinózní karcinom</b>	Karcinom, jehož rakovinné buňky produkují hlen
<b>Tubulární karcinom</b>	Zvláštní typ infiltrujícího prsního karcinomu

Přesná příčina vzniku nádoru prsu není dosud známá, ovšem jsou známy určité rizikové faktory, jež prokazatelně zvyšují pravděpodobnost jeho vzniku. Mezi nejznámější rizikové faktory patří věk, hormonální vlivy, životní styl, životospráva, vystavení organismu škodlivým látkám v životním prostředí a také vysoký socio-ekonomický status (Mansfield, 1993). Mezi významné rizikové faktory patří také výskyt nádoru prsu v rodinné anamnéze. Žena, která má jednu příbuznou prvního stupně diagnostikovanou s nádorem prsu má riziko onemocnění zhruba 2 - násobně vyšší než je riziko běžné populace. Toto riziko však dále narůstá, pokud nádorem prsu onemocněla mladá žena a se zvyšujícím se počtem postižených příbuzných (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001). Obecně lze říci, že riziko vzniku nádoru prsu u ženy, odhadované podle rodinné anamnézy, roste se snižujícím se věkem v době diagnózy a vzrůstajícím počtem postižených příbuzných v rodině (Macháčková et al., 2006). Jak velká je riziko vzniku onemocnění lze odhadnout podle tzv. Clausových tabulek (Claus et al., 1993, 1994). Z hlediska přítomnosti / absence dalších karcinomů v rodinné anamnéze můžeme výskyt karcinomu prsu dělit na sporadickou a familiární resp. dědičnou formu onemocnění. Karcinom prsu se také nevyskytuje výhradně jen jako samostatná jednotka, ale často se v rodinách sdružuje s dalšími typy karcinomů – například ovária, pankreatu, či kolorekta.

Karcinom prsu není onemocněním vyskytujícím se výhradně a jen u žen, ovšem u mužů dochází k rozvoji onemocnění velmi vzácně. Zejména nosiči mutace v genu *BRCA2*, ale i *BRCA1* jsou ohroženou skupinou (Tai et al., 2007).

Celoživotní kumulativní riziko vzniku karcinomu prsu je v běžné ženské populaci odhadováno na 8–10 % (Zimovjanová, 2009). Toto ve skutečnosti znamená, že přibližně každá desátá žena vyvine karcinom prsu do 80 let věku života.

#### **4.1.1 Sporadická forma karcinomu prsu**

Sporadickou formou karcinomu prsu nazýváme situaci, při které v rodině nemocné ženy nejsou obvykle přítomna žádná další nádorová onemocnění. Současně nejsou u nemocné nalezeny žádné genetické příčiny jejího onemocnění. Velkou roli při vývoji sporadických nádorů prsu hraje zejména věk, mezi další rizikové faktory patří, hormonální vlivy, např. dlouhodobé působení estrogenů (brzká menarché, pozdní menopauza, dlouhodobé užívání orálních kontraceptiv), nuliparita, obezita, nedostatek pohybu, účinky škodlivých látek jako např. alkohol, cigarety, účinky ionizujícího záření, nadměrné vystavení organismu rentgenovému záření v raném věku (Mansfield, 1993). Jako určitý protektivní faktor je u sporadické formy považováno těhotenství v časném věku (Russo et al., 2005). Sporadických typů nádorů je asi 90 % všech nádorů prsu (For et al., 2003). Tato forma karcinomu je výsledkem sériové postupné akumulace získaných a nekorigovaných mutací v genech, bez přítomnosti zárodečné mutace. Změna protoonkogenů na onkogeny spolu s inaktivací tumor-supresorových genů je následována více nezávislými mutacemi v dalších alespoň čtyřech nebo pěti genech, jejichž pořadí pravděpodobně není tolik důležité. Mezi protoonkogeny podílející se na vzniku sporadického karcinomu prsu patří například *myc*, *ccnd1*, *erbB2*. U tohoto typu karcinomu je mutační inaktivace genů *BRCA1* a *BRCA2* vzácná (Kenemans et al., 2004).

#### **4.1.2 Dědičná forma karcinomu prsu**

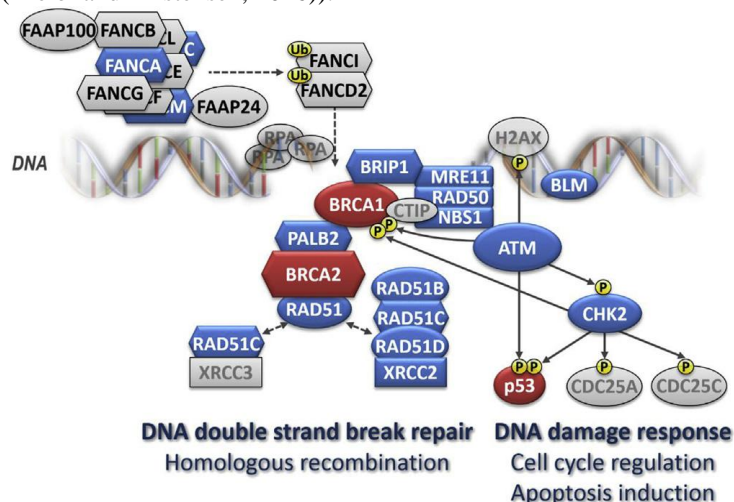
U určité podskupiny nemocných můžeme pozorovat nenáhodnou kumulaci nádorových onemocnění u jejich pokrevních příbuzných. Familiárním karcinomem prsu rozumíme nádorové onemocnění, jež se vyskytuje u alespoň dvou příbuzných prvního stupně, z nichž jeden je pacientem – tedy osobou, podstupující genetickou konzultaci. První významnou zmínku, že karcinom prsu může být dědičným onemocněním uvedl v roce 1866

francouzský anatom a antropolog Paul Broca, který v rodokmenu své manželky, jež trpěla rakovinou prsu, vypožoroval, že stejné onemocnění bylo již příčinou úmrtí ve čtyřech předchozích generacích (Phipps and Perry, 1988).

V případě identifikace příčinné mutace odpovídající za tento nenáhodný výskyt nádorových onemocnění v rodině můžeme hovořit o karcinomu hereditárním, tedy dědičně podmíněném. Dědičná genetická podstata onemocnění (nádorová predispozice) je v případě karcinomu prsu nalezena u přibližně 10 % nemocných. Mezi základní typické znaky dědičné formy karcinomu prsu patří a) kumulace onemocnění v rodině, b) nástup onemocnění v časném věku pacienta (před 50. respektive 40. rokem života), c) zvýšené riziko vzniku dalšího karcinomu prsu (ipsilaterálního nebo bilaterálního) d) specifické přidružené nádory (zejména střeva a vaječníků), e) vertikální přenos po mateřské i otcovské linii f) karcinom prsu u mužů (Larsen et al., 2014).

Vznik hereditárního karcinomu je podmíněn přítomností patogenních, vysoce nebo středně penetrantních mutací v tumor supresorových genech, jež jsou obvykle zapojené v regulaci buněčného cyklu a opravných mechanismech poškozené DNA (Bartkova et al., 2008) (Obr. 5) a jež se s 50% pravděpodobností předávají z rodičů na potomky. Tyto mutace následně ovlivňují funkci genů, potažmo proteinů. Ačkoliv ke kompletnímu vyřazení tumor-supresorového genu je potřeba vyřazení obou alel (mutace má tedy recesivní charakter), dědičnost těchto hereditárních nádorů je autozomálně dominantní s neúplnou penetrancí.

**Obrázek 5** Schéma genů zahrnutých v opravách dvouřetězcových zlomů DNA, asociovaných s karcinomem prsu. Převzato z (Kleibl and Kristensen, 2016)).



Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu je v běžné ženské populaci odhadováno na 8–10 %, zatímco u nosiček mutace v *BRCA1* a *BRCA2* genu dosahuje až 80 %. Je zvýšeno riziko vzniku karcinomu vaječníků u nosiček *BRCA1* až na 50 %, u nosiček *BRCA2* na 20 %, častější jsou i další nádorová onemocnění – karcinomy tlustého střeva, slinivky, žlučových cest a maligní melanom (Zimovjanová, 2009). Pokud jsou dostupné záznamy rodin s evidovaným mnohočetným výskytem nádoru prsu, provedením segregace analýzy lze prokázat přítomnost dominantně zděděné mutace v některém z predispozičních genů ve většině případů (Macháčková et al., 2006).

### 4.1.3 Hlavní predispoziční geny vzniku karcinomu prsu

Karcinom prsu se často vyskytuje společně s ovariálním karcinomem jako hereditární nádorový syndrom (HBOC) (Petráková et al., 2016), kdy přítomnost alespoň jedné příčinné mutace nalezené v tumor supresorových genech *BRCA1* a *BRCA2* výrazně zvyšuje rizika manifestace pro obě onemocnění. Jako další geny prokazatelně asociované s hereditárním karcinomem prsu (u kterých ovšem nebyla prokázána asociace se vznikem karcinomu ovária) byly podle NCCN identifikovány *ATM*, *CDH1*, *CHEK2*, *NBN*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *TP53* (NCCN, 2016). Kompletní přehled klinicky relevantních rizikových genů podle NCCN je uveden v Tab. 2.

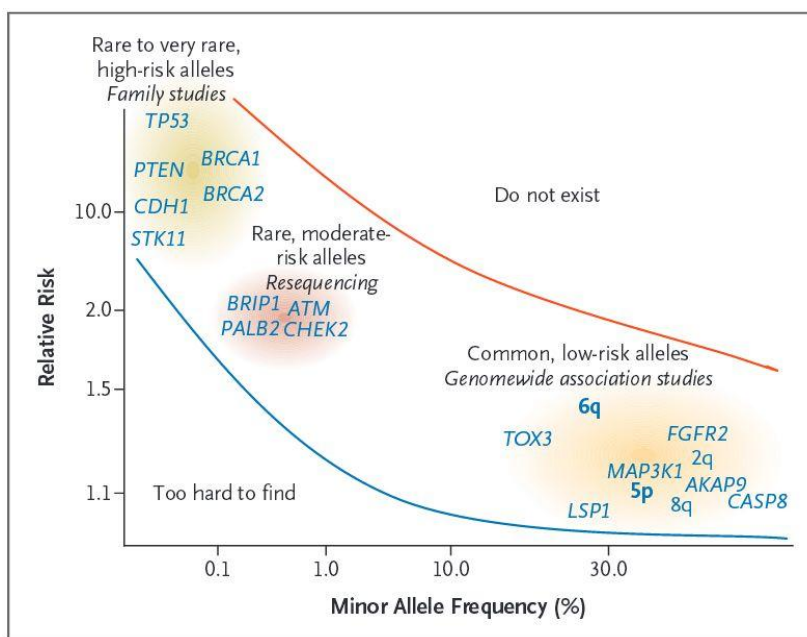
Tabulka 2 Tabulka genů (NCCN, 2016)		
Gen	Riziko karcinomu prsu (C50)	Riziko karcinomu vaječníků (C56)
<i>ATM</i>	Zvýšené	Nezvýšené
<i>BRCA1</i>	Zvýšené	Zvýšené
<i>BRCA2</i>	Zvýšené	Zvýšené
<i>BRIP1</i>	Nezvýšené	Zvýšené
<i>CDH1</i>	Zvýšené (lobulární ca)	Nezvýšené
<i>CHEK2</i>	Zvýšené	Nezvýšené
<i>Lynch SG*</i>	Neznámé	Zvýšené
<i>NBN</i>	Zvýšené	Neznámé
<i>NF1</i>	Zvýšené	Nezvýšené
<i>PALB2</i>	Zvýšené	Neznámé
<i>PTEN</i>	Zvýšené	Nezvýšené
<i>RAD51C</i>	Neznámé	Zvýšené
<i>RAD51D</i>	Neznámé	Zvýšené
<i>STK11</i>	Zvýšené	Zvýšené (neepiteliální ca)
<i>TP53</i>	Zvýšené	Nezvýšené

\* *Lynch SG* - geny predisponující ke vzniku Lynchova syndromu (*MSH*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*)

Predispoziční geny tedy modifikují riziko vzniku karcinomu prsu (a dalších nádorů) nestejně. Zatímco u některých vysoce penetrantních genů je nosičství patogenních alterací spojené s rizikem vysokým, u jiných je zvýšení rizika pouze střední či malé a lze předpokládat, že některé z variant riziko vzniku nádoru snižují a jejich význam je tak protektivní (Pohlreich et al., 2012).

Mutace v predispozičních genech se také objevují v populaci s různou alelickou frekvencí, vyjádřenou jako MAF – Minoritní Alelická Frekvence. Příčinné mutace v těchto genech mohou být spojovány pouze s karcinomem prsu, HBOC ale také mohou být součástí jiných syndromů sdružujících různé nádory např. Lynchův syndrom (Peltomäki, 2005), Li-Fraumeni syndrom (Malkin 2011).

**Obrázek 6** Relativní riziko genů souvisejících s karcinomem prsu. Vysoce rizikové syndromové geny jsou zvýrazněny zeleně, geny se střední mírou rizika jsou zvýrazněny modře. Běžné, málo penetrantní geny jsou podbarveny oranžově. (Převzato z (Foulkes, 2008).



#### 4.1.3.1 BRCA 1, BRCA2 geny

Hereditární karcinom prsu a vaječníků (HBOC) je syndrom spojovaný především s mutacemi v genech *BRCA1* a *BRCA2* (z angl. BReast CAncer; OMIM 113705; 600185). Je nejčastější příčinou dědičných forem karcinomu prsu a vaječníků a vyskytuje se u všech etnických a rasových populací (Petrucci et al., 2010). Tyto geny byly objeveny v roce 1994 a 1995. *BRCA1* leží na dlouhém raménku chromozomu 17 (17q21), *BRCA2* se

nachází na dlouhém raménku chromozomu 13. (13q12-13). Oba geny jsou v celku velké (*BRCA1* o velikosti 110kb, má 24 kódujících exonů, s celkovou velikostí kódující oblasti >5,5 kb; *BRCA2* je velký cca 70kb, má 27 exonů a velikost kódující oblasti >10 kb) (Miki et al., 1994; Wooster et al., 1995). Tyto geny produkují jaderné proteiny, exprimované především v G2 a S fázi buněčného cyklu a interagují s dalšími proteiny buněčného jádra. Jejich proteiny se účastní řady pochodů pro udržení genomové integrity, jako je například oprava dvouvláknových zlomů DNA (Liu and West, 2002), regulace transkripce, regulace buněčného cyklu (Yoshida and Miki, 2004). Protože se jedná o tumor-supresorové geny, přítomnost mutace pouze na jedné z alel nevede k fenotypovým projevům. Pokud ovšem dojde k mutaci i druhé alely, není produkován žádný funkční protein, a tím dochází k narušení jejich funkcí, k nestabilitě genomu a kumulaci dalších genetických změn. Dosud identifikované mutace jsou charakterizované jako dlouhé delece, záměny, inserce, a sestřihové varianty, jež mají škodlivý vliv na správnou funkci proteinů *BRCA1* a *BRCA2*. V případě familiárního karcinomu je genetické testování těchto genů nejvhodnější provádět u pacienta s nejčasnějším nástupem onemocnění, případně výskytu bilaterálního karcinomu či duplicitou nádoru prsu a vaječníků, u kterých je nejpravděpodobnější hereditární příčina onemocnění (Foretová et al., 2016). Mutace v *BRCA1* jsou také významné pro vznik jiných nádorů. Například muži nesoucí mutace v tomto genu mají v porovnání s ostatní neselektovanou populací až trojnásobně zvýšené riziko vzniku nádoru prostaty (Macháčková et al., 2006).

#### 4.1.3.2 *PALB2* gen

Gen *PALB2* (*FANCN*; OMIM 610355) je gen lokalizovaný na 16. chromozomu v pozici 16p12.2. Kóduje DNA reparační protein, jež byl objeven jako součást endogenního multiproteinového komplexu BRCA2. Společně s proteiny BRCA1 a BRCA2 se *PALB2* funkčně podílí na opravách dvouřetězcových zlomů DNA pomocí homologní rekombinace (Xia et al., 2006; Zhang et al., 2009). Dědičné mutace v genu *PALB2* jsou u heterozygotních nosičů spojeny se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu a pankreatu. Riziko vzniku karcinomu prsu u nosiček mutací *PALB2* genu se odhaduje na 33–58 % v závislosti na počtu příbuzných s tímto onemocněním (Janatová et al., 2016). Mutace v homozygotní formě tohoto genu (spolu s dalšími ze skupiny genů *FANC*) jsou příčinou vzácného onemocnění Fanconiho anémie (Tischkowitz and Xia, 2010). V současné době je



gen *PALB2* řazen jako gen na pomezí střední a vysoké penetrance, ovšem pro přesný odhad jsou potřeba další analýzy v různých populacích (Janatová et al., 2016).

#### 4.1.3.3 *CHEK2* gen

Gen *CHEK2* (OMIM 604373), kódující serin/threoninovou kinázu Chk2 leží na krátkém raménku 22. chromozomu v pozici 12.1. V normálním stavu je CHK2 přítomen v jádře v neaktivní monomerní formě. V případě poškození DNA je CHK2 fosforylován, nejprve v místě Thr68 a následně v SQ/TQ doméně (Zannini et al., 2014) pomocí ATM, tím dochází k jeho aktivaci a nadále svou funkcí fosforyluje a tím aktivuje p53, čímž se podílí také na kontrole buněčného cyklu (Nevanlinna and Bartek, 2006). První potenciálně patogenní varianty genu *CHEK2*, jež by přispívaly ke vzniku hereditárního karcinomu prsu, byly identifikovány v roce 1999. Tehdy *Bell et al.* publikoval, že našel 3 germinální mutace v genu *CHEK2* u 3 ze 4 rodin manifestujících Li- Fraumeni syndrom. Jedna z variant byla vyhodnocena jako polymorfismus, varianta c.1100delC (p.T367M) delece v exonu 10, kódujícím kinázovou doménu proteinu, byla prokázána jako patogenní a přispívající ke vzniku hereditárního karcinomu prsu. U varianty c.470T >C (I157T), záměnné mutace v FHA doméně v exonu 3 je interpretace jejího významu doposud nejasná (Nevanlinna and Bartek, 2006). Gen *CHEK2* patří mezi středně penetrantní geny, ve kterém bylo nalezeno mnoho variant. Nejvíce testovaná mutace c.1100delC, která prokazatelně zvyšuje riziko vzniku karcinomu prsu, patří mezi populačně specifické. Zatímco v Nizozemí a Finsku se jedná o velmi častou variantu, na jihu Evropy se téměř nevyskytuje. V České republice je její frekvence také relativně nízká (Kleibl et al., 2005). Frekvence varianty c.1100delC v různých státech je uvedena v Tab. 3. Naproti tomu, byla v genu *CHEK2* u pacientů českého a slovenského původu v roce 2006 identifikována a publikována velká intragenová delece zahrnující exony 9 a 10 (c.909-2028\_1095+330del5395, p.M304Lfs\*16). Jedná se tedy pravděpodobně o slovanskou founder mutaci, jejíž geografický a etnický rozsah ještě nebyl určen (Cybulski et al., 2006).



**Tabulka 3** Počty pacientů a kontrol s patogenní variantou c.1100delC *CHEK2* v různých státech Evropy. (Převzato z Kleibl et al. 2005).

Country	Breast cancer patients		Controls	
	Total	1100delC (%)	Total	1100delC (%)
Netherlands	2851	102 (3.58)	909	9 (0.99)
Finland	1489	34 (2.28)	2332	31 (1.33)
UK	3450	42 (1.21)	4037	21 (0.52)
Germany	516	8 (1.55)	1315	6 (0.46)
USA	300	3 (1.00)	1665	5 (0.30)
Israel	219	1 (0.46)	146	0
Czech Republic	1046	4 (0.38)	730	2 (0.27)
Poland	N.S.	–	1921	4 (0.21)
Australia	1474	10 (0.68)	736	1 (0.14)
Italy	939	1 (0.11)	334	0
Spain	456	0	400	0

#### 4.1.3.4 *TP53* gen

Gen *TP53* (Tumor Protein p53, OMIM 191170) byl téměř před třiceti lety identifikován jako jeden z prvních tumor–supresorových genů (Lane and Crawford, 1979). Je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 17 (17p13.1) a kóduje protein p53, jež funguje jako transkripční faktor a senzor poškození DNA. Při zjištění poškození DNA dojde k uvolnění a aktivaci p53, který dále aktivuje v jádře p21, což je inhibitor cyklin-dependentních kináz v buněčném cyklu. Tím tedy dojde k zastavení buněčného cyklu a dále dochází buď k reparaci DNA, nebo apoptóze. Tím se eliminuje riziko vzniku a množení nádorových buněk (Wahl et al., 1997). Tento gen je asociován se vznikem nejružnějších nádorů (O’Brate and Giannakakou, 2003) a také nádorových syndromů (jako je například Li–Fraumeni syndrom) (Varley, 2003).

#### 4.1.3.5 Další geny zapojené do oprav poškození DNA

Mezi další predispoziční geny patří obecně skupina genů zapojených do oprav dvouvláknových zlomů. Produkty těchto genů jsou funkčně spojeny s rozeznáním a reparací poškozené DNA. Nepřetržitě monitorují chromozomy a opravují poškozené nukleotidové zbytky, vzniklé vystavením karcinogenům a cytotoxickým látkám. Toto poškození může být důsledkem environmentálních činitelů, ale také endogenními faktory (Wood et al., 2001). Oprava dvouvláknových zlomů je prováděna buď cestou homologní rekombinace, nebo nehomologním připojením konců (NHEJ – non homologous end-joining). Pro oba způsoby oprav je zapotřebí nejprve rozeznání zlomu pomocí proteinového komplexu obsahujícího geny *NBS1*, *MRE11* a *RAD50* (Featherstone and

Jackson, 1998). U nehomologní reparace dochází k navázání proteinu KU70 a KU80 na DNA v místě zlomu, po které následuje aktivace DNA-protein kinázy (DNA-PK). Fosforylací této protein kinázy dochází k její aktivaci a následně k rekrutování *XRCC4* a ligázy 4, které zlom opraví (Kuschel et al., 2002). Homologní rekombinace zahrnuje výměnu řetězců katalyzovanou *RAD51* s přímou interakcí s *RAD52*. S *RAD51* také přímo interaguje DNA-dependentní ATPáza *RAD54*, *XRCC2*, *XRCC3* a další (Khanna and Jackson, 2001). Tyto (a mnohé další) geny zapojené v opravách dvouvláknových zlomů jsou tedy dobrými kandidátními geny, jejichž mutantní varianty mohou přispívat ke vzniku karcinomu prsu (Kuschel et al., 2002).

#### 4.1.3.6 Další geny asociované s karcinomem prsu

Mezi další geny, u nichž byly nalezeny prokazatelně patogenní varianty, patří *PTEN*, *NF1*, *CDH1*, *STK11*. Ve všech případech se jedna o tumor-supresorové geny. Klinicky relevantní nalezené mutace v genu *PTEN* jsou asociovány s manifestací onemocnění karcinomu prsu jako součást Cowdenova syndromu (Pilarski, 2009). *NF1* je gen kódující protein neurofibromin 1, jehož mutantní varianty jsou asociovány s dědičným onemocněním neurofibromatózy typu 1a také s několika typy karcinomů, včetně karcinomu prsu (Howell et al., 2017). *CDH1* kóduje kadherin, zděděné mutace v tomto genu zvyšují riziko vzniku lobulárního karcinomu prsu (Corso et al., 2016). Gen *STK11* a zděděné mutace v něm významně zvyšují riziko rozvinutí karcinomu prsu jako součást Peutz – Jeghersova syndromu (Huang et al., 2015)

#### 4.1.4 Geny zapojené do metabolismu estrogenů

Karcinom prsu patří mezi hormonálně dependentní nádor, proto další uvažovanou skupinou možných příčinných genů, respektive jejich mutací, jsou geny kódující proteiny zapojené do metabolismu estrogenů.

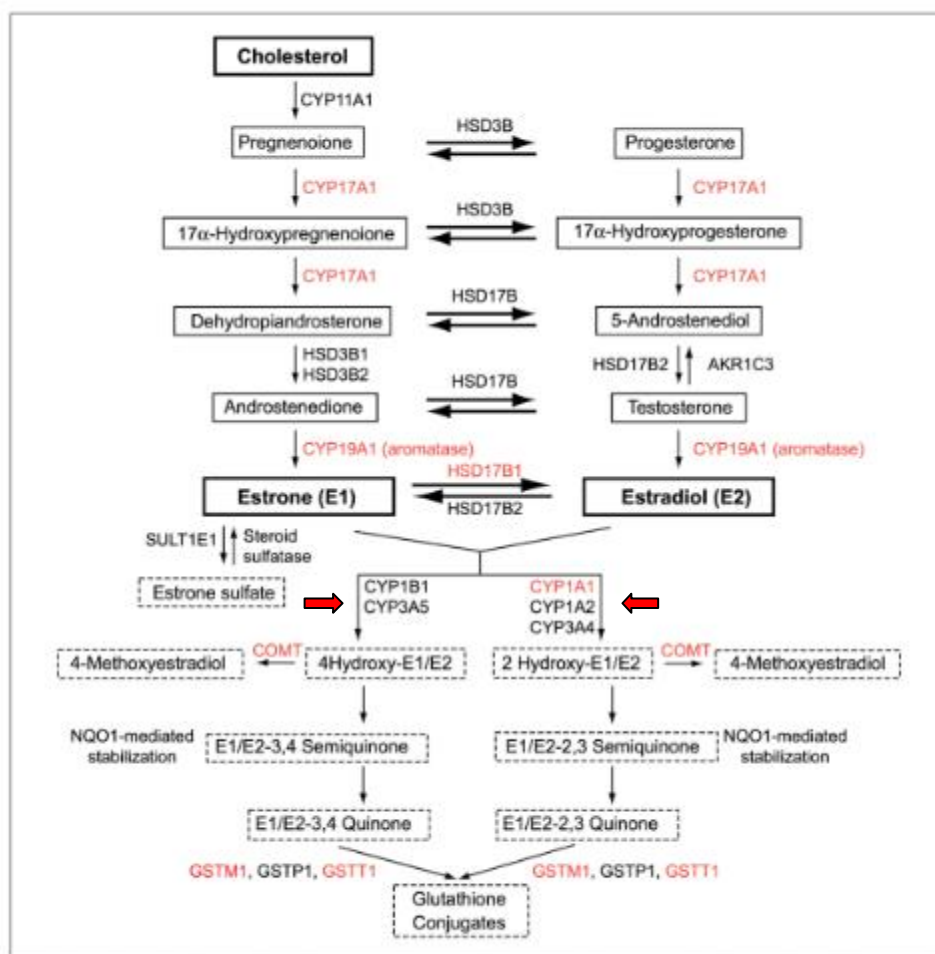
Estrogeny patří mezi steroidní hormony odvozené z C27 cholesterolu, především pak z LDL-cholesterolu (Carr et al., 1983). Nejprve je cholesterol za pomoci steroidního akutního regulačního proteinu přenesen do mitochondrií (Miller and Strauss, 1999), kde je přeměněn na pregnolonon. Pregnenolon je prekurzorem všech steroidních hormonů. Je metabolizován různými enzymy a při působení enzymu 17- hydroxylázy / 17,20 – lyázy se

přemění na progesteron nebo androstendion. Androstendion může být dále metabolizován na jiné androgeny nebo estrogeny (Samavat and Kurzer, 2015). Hlavními estrogeny cirkulujícími v lidském těle jsou estradiol, estron a 16 - hydroxyestradiol (estriol). Estriol je nejhojnějším estrogenem u těhotných žen. Estradiol je nejvíce biologicky aktivním estrogenem. U premenopauzálních žen je estradiol syntetizovaný ve vaječnících nejdůležitějším estrogenem, zatímco u žen postmenopauzálních převládá estron syntetizovaný v periferních tkáních. Aromatáza (CYP19), kódovaná *CYP19A1* Je enzym omezující rychlost při katalýze konverze androgenů na estrogeny (Tsuchiya et al., 2005). Vzhledem k významu tohoto enzymu je blokování aktivity aromatázy důležitým farmakologickým nástrojem, který se používá k léčení onemocnění závislých na estrogenu, jako je karcinom prsu, endometrióza a karcinom endometria.

Estradiol a estron se metabolizují třemi kompetitivními způsoby zahrnující ireverzibilní hydroxylázy katalyzované enzymy CAD (cytochrom P450) závislými na NADPH, jako např. CYP1A1, CYP1B1 a CYP1A2. Kvantitativně je 2 - hydroxylační dráha hlavní metabolickou cestou ve srovnání s cestami 4- a 16 - hydroxylace. Enzymy cytochromu P-450, včetně CYP1A1 a CYP1B1, jsou hlavními enzymy fáze I, které jsou hlavně exprimovány v tkáních prsu a jater (Huang et al., 1996). Tyto enzymy spolu s CYP1A2 katalyzují C2 hydroxylaci rodičovských estrogenů na jejich jednotlivé katecholové estrogeny (Cribb et al., 2006). Dvojhydroxylované estrogeny mají nízkou vazebnou afinitu k estrogenímu receptoru (ER) (van Aswegen et al., 1989). Tyto metabolity vykazují sníženou hormonální účinnost ve srovnání s estradiolem a mají také neestrogenní a antiestrogenní účinky. Existují určité důkazy o studiích buněčné kultury u buněk ER + humánních MCF-7, které naznačují, že 2 – hydroxyestron a 2-hydroxyestradiol inhibují buněčný růst a proliferaci (Schneider et al., 1984). Kromě toho byly 2 - hydroxy metabolity asociovány s normální buněčnou diferenciací a apoptózou (Telang et al., 1997). Estron a estradiol se hydroxylují v polohách C2, C4 a C16 a převádějí se na katecholové estrogeny (2 - hydroxyestron, 4 - hydroxyestron, 2 - hydroxyestradiol a 4-hydroxyestradiol) a 16 $\alpha$ -hydroxyestron. Současně bylo prokázáno, že 2 - hydroxyestrogeny mohou poškodit DNA a generovat volné radikály při redoxních reakcích, či pokud je inhibována COMT (katechol – O - metyltransferáza) (Zhu and Liehr, 1993). Katecholové estrogeny jsou poté konjugovány s kyselinou glukuronovou a jaterními enzymy včetně UDP-glukuronosyltransferáz a sulfotransferáz. Konjugace je detoxifikační reakce, při níž

se hormony stávají buď ve vodě rozpustnými a vylučují se do moči, nebo se přemění na lipofilní části s vyšším poločasem rozpadu (Raftogianis et al., 2000).

**Obrázek 7** Schéma biosyntézy a metabolismu estrogenu. Převzato z (Bell et al., 2008).



V současnosti je věnována velká pozornost polymorfním variantám v genech kódujících enzymy účastníci se metabolismu estrogenu a genům kódujícím estrogenové receptory, neboť se předpokládá, že mohou být spojeny s rizikem karcinomu prsu. Vystavení estrogenům je zvažováno jako rizikový faktor karcinomu prsu od zjištění, že bilaterální operativní odstranění vaječníků významně snižuje riziko prsního karcinomu a že snížení rizika je větší, pokud jsou vaječníky dříve odebrány (Trichopoulos et al., 1972). Některé ze známých a prokázaných rizikových faktorů pro karcinom prsu, jako je raný nástup menarche (<12 let), pozdní menopauza (> 55 let), nulliparita nebo porod v pokročilejším věku, souvisejí s celoživotním vystavením prsní tkáně pohlavním hormonům. Vzhledem k tomu, že přibližně 2/3 nádorů prsu je ER pozitivní (ER +) a reaguje na cirkulující estrogény a že téměř všechny ER negativní (ER-) případy jsou odolné vůči endokrinní

terapii, je důležité objasnit specifické mechanismy, kterými jsou estrogeny spojeny se zvýšeným rizikem karcinomu prsu (Parl et al., 2009). Estrogen se pravděpodobně na vzniku tumorigenese podílí tím, že se váže na estrogenové receptory a chová se jako transkripční faktor genů, které jsou zapojeny v regulaci buněčného cyklu, buněčném růstu a organizaci cytoskeletu. U časných stádií karcinomu prsu je frekventně pozorována nadměrná exprese estrogenového receptoru alfa (zvýšená aktivita jeho promotoru) i beta (Hayashi et al., 2003).

## 4.2 Genetické testování

S ohledem na vysokou frekvenci výskytu onemocnění a ekonomické aspekty není v současné době možné provádět testování dědičné predispozice ke vzniku karcinomu prsu u všech žen s tímto onemocněním. Dlouhodobě jsou proto sestavována kritéria indikující nemocné ke genetickému vyšetření, která zvyšují pravděpodobnost záchytu mutace. Základní kritéria pro testování germinálních mutací v genech *BRCA1/2* u pacientek či u rodin s výskytem nádorů prsu nebo ovárií byla publikována v roce 2009 komisí složenou z lékařských genetiků, onkologů a gynekologů. Cílem genetického testování je zvýšit záchyt mutací v rodinách, rozšířit prevenci a zajistit důležité údaje pro cílenou nádorovou léčbu. Všeobecně se doporučuje testování v takových případech, kdy primární pravděpodobnost nalezení mutace převyšuje 10 % (Foretová et al., 2016). U neselektovaného karcinomu prsu je pravděpodobnost záchytu mutace asi 3-7% zatímco neselektované nádory ovaria lze zachytit s frekvencí vyšší než 10% (Minion et al., 2015). Je nutné, aby se tato předpokládaná významná četnost dědičných karcinomů ovarii odrazila i v úpravě indikací, neboť profylaktické operace pomocí adnexektomií jsou nejúčinnější prevencí většinou neléčitelného onemocnění u nosiček mutací. Vzhledem k tomu, že patogenní mutace je detekována u asi 23 % testovaných probandek s nádorem prsu nebo ovaria, je nutné upravit a nastavit kritéria tak, aby byl umožněn četnější záchyt dědičně disponovaných osob (Foretová et al., 2016). Genetické testování pro dědičný syndrom nádorů prsů a ovarii se provádí po konzultaci s lékařským genetikem a po zvážení osobní i rodinné anamnézy. Každé lékařem indikované testování genů *BRCA1,2* musí zahrnovat kompletní vyšetření všech exonů a exon-intronových spojení a vyšetření velkých přestaveb obou genů (velké delece nebo inserce). V současnosti s rozvojem NGS se významně rozšiřuje spektrum testovaných genů a tím i spektrum záchytu možných predispozičních

mutací (Walsh et al., 2011). Senzitivita tohoto testování se pohybuje v rozmezí 95-99 % (Foretová et al., 2016).

#### 4.2.1 Stávající indikační kritéria ke genetickému testování

Indikační kritéria jsou schválena Společností lékařské genetiky a genomiky ČSL JEP a vycházejí z doporučení NCCN (NCCN, 2016). V současné době jsou tato kritéria platná v České republice a splňuje je přibližně 30-40 % pacientů s diagnózou karcinomu prsu. Přehled indikačních kritérií je uveden v Tabulce 4.

**Tabulka 4** Aktuálně platná indikační kritéria schválena Společností lékařské genetiky a genomiky ČLS JEP

Sporadické formy
<ul style="list-style-type: none"> <li>epitelový karcinom ovaria/tuby/primární peritoneální karcinom v jakémkoliv věku</li> <li>triple negativní karcinom (receptory ER, PR a HER2 negativní) prsu do 60 let (medulární karcinomy prsu se téměř vždy shodují s TNBC)</li> <li>unilaterální karcinom prsu do 45 let (do 50 let pokud není známá vůbec rodinná anamnéza)</li> <li>dva samostatné primární karcinomy prsu, první do 50 let, nebo oba do 60 let (bilaterální nebo ipsilaterální/synchronní nebo metachronní)</li> <li>duplicita karcinomu prsu a slinivky v jakémkoliv věku</li> <li>karcinom prsu u muže v jakémkoliv věku</li> <li>triple negativní karcinom (receptory ER, PR a HER2 negativní) prsu do 60 let (medulární karcinomy prsu se téměř vždy shodují s TNBC)</li> </ul>
Familiární formy
<ul style="list-style-type: none"> <li>karcinom ovaria, tuby nebo primární peritoneální v rodinné anamnéze je vždy indikací k testování</li> <li>3 příbuzní</li> <li>alespoň 3 příímí příbuzní (včetně probandky) s karcinomem prsu v jakémkoliv věku</li> <li>2 příbuzní</li> <li>2 přímé příbuzné (včetně probandky) s karcinomem prsu, alespoň jedna diagnostikována ve věku pod 50 let, nebo obě do 60 let (empirické riziko karcinomu prsu je pro přímé příbuzné nad 20 %, tj. vysoké, a doporučujeme MRI prsou)</li> <li>probandka s karcinomem prsu do 50 let s přímým příbuzným s nádorem spojeným s HBOC (především karcinom slinivky, prostaty)</li> </ul>
prediktivní testování známé rodinné mutace u příbuzných od 18 let věku
Pozn: TNBC – triple negativní karcinom prsu, HBOC – hereditární karcinom prsu a ovaria

## 4.2.2 Využití sekvenování nové generace v diagnostice

Metody sekvenování nové generace kvůli svému principu paralelizace nabízí rychlé a ekonomické osekvenování velkého množství vzorků najednou. Tímto způsobem je možné lékařům poskytnout v krátké době správné a přesné výsledky, což je v molekulární diagnostice nepostradatelné. NGS může být využito například k celogenomovému sekvenování *de novo* dosud neznámých genomů, cílenému sekvenování vybraných úseků DNA, RNA, případně k detekci počtu kopií a balancovaných chromozomových aberací. V současné době je dostupná řada různých technologií, avšak pro svou robustnost a uživatelský komfort je nejčastěji používanou technologií platforma Illumina, jež využívá principu sekvenování pomocí syntézy (SBS - Sequencing By Synthesis).

## 4.2.3 Výstupy testování

Zjištěné výsledky testování jsou pacientovi sděleny v rámci genetické konzultace, jež obsahuje informace o patogenitě nalezené mutace, klinický význam ve formě odhadovaných rizik nádorů a doporučení pro možné prediktivní testování příbuzných. Výsledkem testování může být nalezení prokazatelně patogenní mutace ve vysoce penetrantním genu či nalezení varianty s neznámým klinickým účinkem ve vysoce penetrantním genu – varianta nejasného významu, kdy prediktivní testování je sporné a není indikováno, nebo varianta hodnocena na základě predikce a multifaktoriálních studií jako pravděpodobně patogenní, zde je prediktivní testování indikováno, či definitivně patogenní mutace. V případě nalezení varianty ve středně rizikových genech u kterých není ustálená preventivní péče, se doporučuje prevence na základě rodinné anamnézy pacienta.

## 5 Materiály a metody

### 5.1 Vyšetřovaný soubor

Pro analýzu genetické predispozice ke vzniku karcinomu prsu byly využity vzorky zárodečné DNA izolované z leukocytů periferní nesrážlivé krve od patientek léčených na Onkologické klinice 1. LF UK a VFN v Praze, které byly po podepsání informovaného souhlasu schváleného etickou komisí VFN konsekutivně zařazované do projektu v letech 2014 – 2017. Od všech žen byly získány relevantní klinické a anamnestické údaje, podle kterých bylo stanoveno, zda splňují či nesplňují platná indikační kritéria pro genetické testování nádorové predispozice vzniku karcinomu prsu ČR.

Celkem byl genetický materiál získán od 1128 žen s diagnózou karcinomu prsu v osobní anamnéze. Z nich byly dosud získány kompletní anamnestické údaje od celkem 1033.

Pro komplexní analýzu dědičné predispozice s využitím sekvenování nové generace (cíl i) diplomové práce; část 5.2) byla vybrána podskupina 263 patientek zařazených do studie v letech 2014 – 2015. Z vyšetřovaného souboru splňovalo 89 (33,8 %) žen platná indikační kritéria pro genetické testování, 174 (66,2 %) žen indikační kritéria nesplňovalo, a tudíž by v současné době nebyly testovány. Detailní charakteristika souboru patientek je uvedena v Tab. 5. Současně byla s využitím NGS přístupu vyšetřena skupina 317 nenádorových kontrol složená z 301 žen (medián věku 69 let; věkové rozmezí 52-84 let) a 16 mužů (medián věku 71,5 let; věkové rozmezí 70-74 let) bez onkologického onemocnění v osobní anamnéze ani u příbuzných prvního stupně (rodiče, sourozenci, děti).

Cílené vyšetření přítomnosti kandidátních variant c.92dupG (rs200579169) v exonu 2 genu *CYP3A5* a c.816T>A (rs140421378) exonu 2 genu *CYP1A2* zapojených do metabolismu estrogenů s využitím HRM analýzy (cíl ii) diplomové práce; část 5.3) bylo provedeno na celém souboru 1033 patientek s karcinomem prsu, kde 357 (34,5 %) žen indikační kritéria splňovala a 584 (56,5 %) žen tato kritéria nesplňovala. U 92 žen v době zpracování výsledků jejich klinické údaje ještě nebyly doplněny. Podrobná charakteristika souboru je uvedena v Tab. 6. Stejná mutační analýza byla provedena na souboru 662 neselektovaných kontrol (medián věku 67 let; věkové rozmezí 12-97 let).



<b>Tabulka 5</b> Charakteristika souboru na NGS analýzu			
<b>Pacient</b>	<b>Celkem</b>	<b>IK nesplňují</b>	<b>IK splňují</b>
<b>N=</b>	<b>263</b>	<b>174</b>	<b>89</b>
<b>Průměrný věk</b>	<b>52,3</b>	<b>57,3</b>	<b>42,5</b>
<35	23(8,7)	0(0)	23(25,8)
35-45 (<45)	37(14,1)	0(0)	37(41,6)
45-55 (<55)	90(34,2)	74(42,5)	16(18)
55-65 (<65)	85(32,3)	74(42,5)	11(12,4)
≥65	28(10,6)	26(14,9)	2(2,2)
<b>Histologický typ (% ze známých)</b>			
Duktální	198(75,6)	126(72,8)	72(80,9)
Duktální in situ	25(9,5)	19(11)	6(6,7)
Lobulární	20(7,6)	14(8,1)	6(6,7)
Lobulární in situ	4(1,5)	2(1,2)	2(2,2)
Mucinózní	6(2,3)	5(2,9)	1(1,1)
Tubulární	5(1,9)	4(2,3)	1(1,1)
Jiný	4(1,5)	3(1,7)	1(1,1)
NA	1	1	0
<b>Imunohistochemický podtyp (% ze známých)</b>			
Luminal A	79(34,1)	59(39,1)	20(24,7)
Luminal B	103(44,4)	69(45,7)	34(42)
<i>HER2- pozitivní</i>	69(0)	44(0)	25(0)
<i>HER2- negativní</i>	34(0)	25(0)	9(0)
HER2- pozitivní	29(12,5)	20(13,2)	9(11,1)
Basal-like	21(9,1)	3(2)	18(22,2)
NA	31	23	8
<b>Menopauza stav (% ze známých)</b>			
Pre	119(45,2)	47(27)	72(80,9)
Post	144(54,8)	127(73)	17(19,1)
<b>Klinické stadium (% ze známých)</b>			
IA	(50,2)	65(48,9)	39(52,7)
IB	(6,3)	11(8,3)	2(2,7)
IIA	(27,1)	33(24,8)	23(31,1)
IIB	(7,2)	12(9)	3(4,1)
IIIA	(5,8)	8(6)	4(5,4)
IIIC	(2,9)	3(2,3)	3(4,1)
IV	(0,5)	1(0,8)	0(0)
NA	56	41	15
<b>Grade (% ze známých)</b>			
1	(28)	50(32,7)	13(18,1)
2	(41,3)	62(40,5)	31(43,1)
3	(30,7)	41(26,8)	28(38,9)
NA	38	21	17

**Tabulka 6** Charakteristika souboru patientek pro HRM analýzu. Z celkového počtu 1033 vyšetřených žen byla klinická data dostupná u 941. U celkem 92 žen nebyly do dubna 2018 doplněny žádné klinické údaje, proto nejsou tyto vzorky zařazeny do žádné ze dvou podskupin testovaného souboru (IK splňují/nespĺňují).

Pacient	Celkem	IK nespĺňují	IK splňují
N=	1033	584	357
<b>Průměrný věk</b>	54,18	60,27	44,36
<35	50 (5,4)	0 (0)	50 (14)
35-45 (<45)	177 (19)	1 (0,2)	176 (49,3)
45-55 (<55)	267 (28,6)	189 (32,8)	78 (21,8)
55-65 (<65)	249 (26,7)	211 (36,6)	38 (10,6)
≥65	190 (20,4)	175 (30,4)	15 (4,2)
NA	100	8	0
<b>Histologický typ (% ze známých)</b>			
Duktální	685 (74,1)	410 (71,9)	275 (77,7)
Duktální in situ	65 (7,0)	48 (8,4)	17 (4,8)
Lobulární	97 (10,5)	67 (11,8)	30 (8,5)
Lobulární in situ	6 (0,6)	5 (0,9)	1 (0,3)
Mucinózní	18 (1,9)	14 (2,5)	4 (1,1)
Tubulární	9 (1,0)	7 (1,2)	2 (0,6)
Jiný	44 (4,8)	19 (3,3)	25 (7,1)
NA	109	14	3
<b>Imunohistochemický podtyp (% ze známých)</b>			
Luminal	6 (0,7)	4 (0,8)	2 (0,6)
Luminal A	320 (39,1)	232 (45,9)	88 (28)
Luminal B	313 (38,2)	196 (38,8)	117 (37,3)
HER2- pozitivní	67 (8,2)	45 (8,9)	22 (7)
Basal-like	96 (11,7)	19 (3,8)	77 (24,5)
Neznámý	17 (2,1)	9 (1,8)	8 (2,5)
NA	214	79	43
<b>Menopauza stav (% ze známých)</b>			
Pre	398 (42,6)	121 (21)	277 (77,6)
Peri	3 (0,3)	3 (0,5)	0 (0)
Post	533 (57,1)	453 (78,5)	80 (22,4)
NA	99	7	0
<b>Klinické stadium (% ze známých)</b>			
IA	12 (5)	10 (8,4)	2 (1,6)
IB	0 (0)	0 (0)	0 (0)
IIA	51 (21,1)	21 (17,6)	30 (24,4)
IIB	80 (33,1)	36 (30,3)	44 (35,8)
IIIA	29 (12)	8 (6,7)	21 (17,1)
IIIB	36 (14,9)	21 (17,6)	15 (12,2)
IIIC	9 (3,7)	6 (5)	3 (2,4)
IV	25 (10,3)	17 (14,3)	8 (6,5)
NA	791	465	234
<b>Grade (% ze známých)</b>			
1	195 (25,7)	149 (31,4)	46 (16,1)
2	328 (43,2)	210 (44,3)	118 (41,4)
3	236 (31,1)	115 (24,3)	121 (42,5)
NA	274	110	72

### 5.1.1 Odběr a zpracování biologických vzorků

Vzorky periferní krve o objemu cca 6 ml byly odebrány do zkumavek s chelatačním činidlem EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) Vlastní izolace DNA byla provedena v laboratoři ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK. Pro analýzu byla použita genomová DNA izolovaná z leukocytů periferní žilní nesrážlivé krve pomocí v laboratoři rutinně používaného Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Přehled reagensů pro izolaci je uveden v Tab. 7.

<b>Tabulka 7</b> Přehled reagensů použitých pro izolaci DNA	
<b>Reagencie</b>	<b>Objem V [ml]</b>
Cell Lysis Solution	9
Nuclei Lysis Solution	3
Protein Precipitation Solution	1
Izopropanol	3
EtOH 70%	3
DNA Rehydration Solution	0,8-1

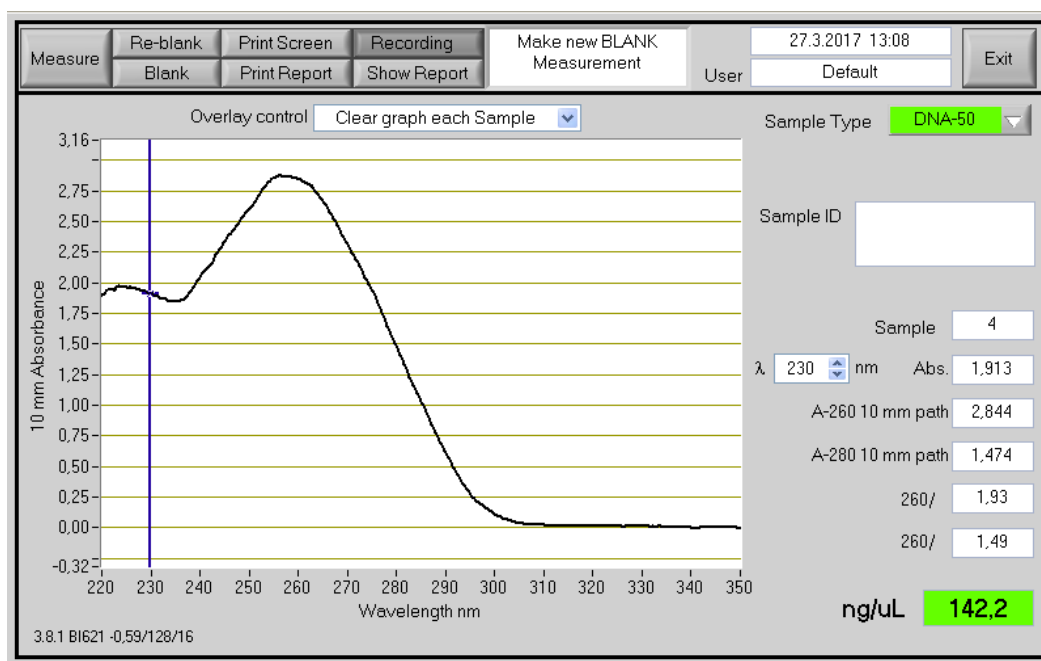
Takto izolovanou DNA lze skladovat při teplotě 2-8°C.

### 5.1.2 Měření koncentrace a ověření čistoty DNA

Koncentrace (c) byla změřena pomocí přístroje NanoDrop 1000. Tento přístroj měří koncentraci DNA spektrofotometricky, tedy měří intenzitu absorpce látek rozpuštěných v roztoku. Aromatické struktury bazí v DNA absorbují UV-záření nejvíce při vlnové délce 260 nm. Výstup měření je názorně uveden na Obr. 8.

Protože je ale DNA izolována z buněk, mohou její roztoky být kontaminovány proteiny. Aromatické aminokyseliny jako fenylalanin a tyrozin také absorbují UV-záření, specificky vlnové délky 280 nm. Poměrem absorbance při vlnové délce 260 nm ku 280 nm lze změřit tzv. čistotu nukleové kyseliny - tedy na kolik je daný vzorek nukleové kyseliny kontaminován proteiny. Poměr cca 1,8 je považován za čistou DNA, nižší hodnota indikuje znečištění vzorku.

**Obrázek 8** Záznam měření koncentrace a čistoty dsDNA na přístroji NanoDrop 1000. Naměřená koncentrace vzorku je zde 142,2ng-uL, čistota 260/280 ukazuje na kontaminaci proteinu DNA je zde 1,93 a pak 260/230 chemické látky – ukazuje na chemické nečistoty vzniklé při izolaci.



## 5.2 NGS analýza

S nástupem NGS je možné v poměrně krátké době najednou identifikovat genetické varianty ve stovkách genů u desítek probandů s ekonomickými náklady nesrovnatelně nižšími než by tomu bylo při analýze jednotlivých genů klasickými postupy molekulární biologie zahrnujícími pre-screening mutací s následnou charakterizací patogenní varianty Sangerovým sekvenováním (Schroeder et al., 2015). Platforma Illumina využívá postup sekvenování pomocí syntézy. Sekvenační proces se skládá ze 4 kroků – přípravy cílové DNA knihovny, strojové zmnožení jednotlivých DNA templatů pro zesílení signálu sekvence (tvorba klastrů), samotná sekvenace, závěrečná analýza dat. Protokol přípravy DNA knihovny je uveden níže. Samotné sekvenování probíhá namnožením k pevně podložce ukotvených ssDNA, které zároveň slouží jako sekvenační templát a postupným omýváním fluorescenčně značenými nukleotidy s modifikovaným 3'OH koncem, kde je navázaný odstranitelný terminátor. Po navázání značeného nukleotidu je jím po excitaci emitováno pro každý typ nukleotidu typické fluorescenční záření, které je následně zachyceno systémem CCD kamer. V každém kroku sekvenace je zařazen pouze jeden

nukleotid a po zaznamenání fluorescence je přítomný terminátor odstraněn. Vzorky byly sekvenovány panelem CZEKANCA, charakterizovaným v další kapitole.

### 5.2.1 Panel CZEKANCA

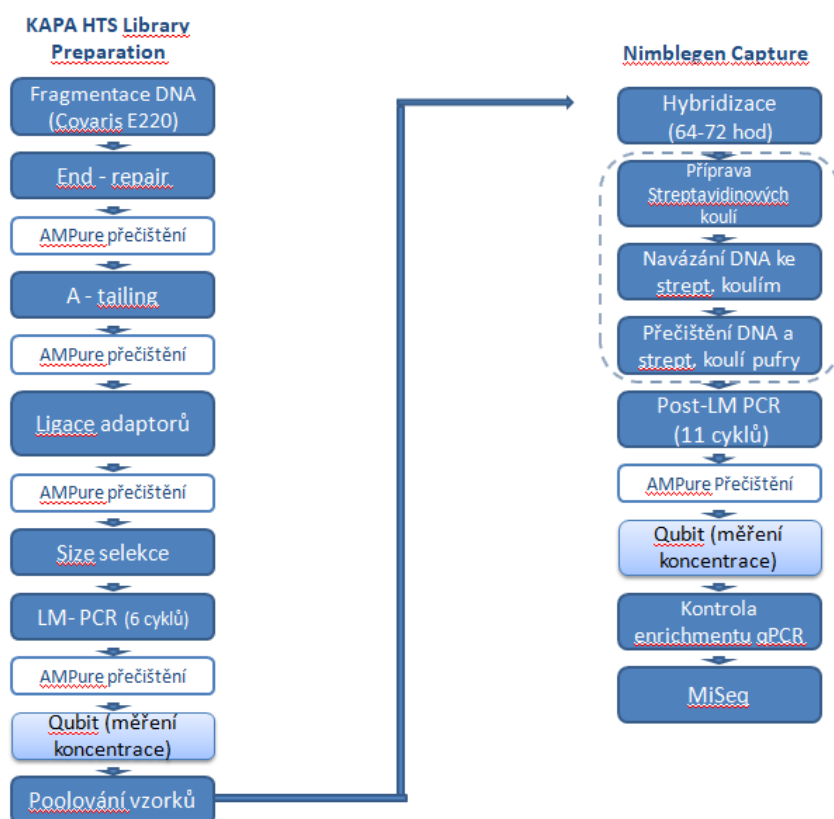
Panel genů CZEKANCA (Czech Cancer paNel for Clinical Application), umožňuje komplexní analýzu germinálních mutací v hlavních predispozičních genech karcinomu prsu i ovária a dále v kandidátních genech asociovaných se zvýšeným rizikem vzniku nejčastějších solidních nádorů v populaci vysoce rizikových pacientů v ČR (Soukupová et al. 2016). Při výběru genů byla zohledněna četnost různých onkologických diagnóz v ČR, aktuální stav informací o genetické podstatě hereditárních nádorových syndromů, předpoklady pro identifikaci dalších kandidátních genů, ale také technické možnosti pro účinný a spolehlivý způsob cíleného obohacení pro účely panelového NGS (Soukupová et al. 2016). V současné době panel CZEKANCA obsahuje sondy cílící na kódující sekvence 219 genů, které jsou z hlediska klinické významnosti rozděleny do tří skupin dle výše RR, uvedené v Tab. 8.

Tabulka 8 Rozdělení genů dle rizika jejich penetrance (Citováno z (Soukupová et al. 2016))		
Skupina	RR	Příklady genů
geny s vysokou penetrancí	>5x	<i>BRCA1, BRCA2, TP53, PTEN, STK11</i>
geny se střední penetrancí	2-5x	<i>FANCM, NBN, ERCC2, WRN, PALB2</i>
geny s nízkou penetrancí	<2x	<i>ATRIP, DPYD, HELQ, PRKDC</i>

### 5.2.2 Pracovní postup přípravy DNA knihovny

Při přípravě DNA knihovny je zapotřebí nejprve fragmentovat vstupní DNA na kratší úseky, pomocí specifických enzymů či fyzikálně pomocí ultrazvuku. V dalším kroku se zarovnají volné konce DNA, a přidá se pomocí standardní Taq polymerázy přesahující A, díky čemuž poté mohou být k DNA naligovány univerzální adaptory. Následně proběhne PCR, ve které se pomocí primerů s přesahujícími unikátními sekvencemi vzorky tzv. naindexují. Pomocí magnetických AMPure XP (Beckmann Coulter) magnetických partikulí v roztoku PEG (polyetylen glykol) se z roztoku vyselektují vybrané fragmenty požadované délky (tzv. size selekce) na základě koncentrace PEG v roztoku a tyto jsou pak dále amplifikovány. Schéma postupu přípravy DNA knihovny je znázorněno na Obr. 9.

**Obrázek 9** Schéma přípravy DNA knihovny.



### 5.2.2.1 Fragmentace DNA

Ultrazvuková fragmentace genomové DNA na očekávanou střední délku 200 bp byla provedena v celkovém objemu 53 ul (ředěno low-TE pufru) ve zkumavkách microTUBE AFA fiber snap-cap na přístroji Covaris E220 model za podmínek: teplota lázně 5°C, čas 45 s. Covaris pracuje na principu přenosu akustické energie při ultrazvukových frekvencích a velmi krátkých vlnových délkách. Zaostřuje tuto energii na vzorek ponořený v deionizované vodě a tím fragmentuje nukleovou kyselinu.

### 5.2.2.2 End-repair

Před procesem, tzv. „End - Repair“, byl připraven mix KAPA End repair Buffer 10x a KAPA End repair Enzyme Mix dle rozpisu uvedeného v Tab. 9. Následně byla přidána DNA a vzorky umístěny do termocykleru nastaveného na 20°C po dobu 30 minut.

<b>Tabulka 9</b> Reagencie End-repair	
<b>Reagencie</b>	<b>Objem [μl]</b>
Fragmentovaná DNA	50
KAPA End Repair Buffer 10x	7
KAPA End Repair Enzyme Mix	5
H <sub>2</sub> O	8
Celkový objem	70

Po skončení inkubace v termocykleru bylo provedeno přečištění pomocí 120μl magnetických koulí AMPure beads a 190 μl 80% ethanolu. Po přečištění se ihned pokročilo k dalšímu kroku – A - Tailing.

### 5.2.2.3 A - Tailing

Směs na A – Tailing byla připravena podle přehledu v Tab. 10.

<b>Tabulka 10</b> Reagencie A-Tailing	
<b>Reagencie</b>	<b>Objem [μl]</b>
KAPA A-Tailing Buffer 10x	5
KAPA A-Tailing Enzyme	3
H <sub>2</sub> O	42
Celkový objem	50

Roztok byl inkubován v termocykleru při 30°C po dobu 30 minut, po kterém opět následovalo přečištění roztoku pomocí 90 μl viskózního roztoku PEG/NaCl SPRI Solution a 190 ul ethanolu.

### 5.2.2.4 Ligace adaptorů

Ligační mix byl připraven dle Tab. 11 níže. Takto připravená reakce byla následně vložena do termocykleru kde probíhala po dobu 15 minut a za teploty 20°C.

<b>Tabulka 11</b> Reagencie na ligaci adaptorů	
<b>Reagencie</b>	<b>Objem [μl]</b>
KAPA Ligation buffer (5x)	10
iAdapter_work solution 15uM (160531)	3,5
KAPA DNA Ligase	5
dH <sub>2</sub> O	31,5
Celkový objem	50

Po pětiminutové inkubaci s přidáním 50 μl PEG/NaCl SPRI byl roztok znovu promyt 190 μl 80%ethanolu.

### 5.2.2.5 Výběr fragmentů požadované délky - size selekce

Přidáním 60 µl PEG/NaCl SPRI Solution do výsledného roztoku, jeho následným umístěním na magnet a odsátím supernatantu do nové eppendorfky byly z roztoku eliminovány fragmenty delší, než 450 bp. K supernatantu bylo dále připipetováno 20 µl AMPure XP koulí, což zabezpečilo navázání fragmentů o délce cca 250 bp na paramagnetické koule a tak jejich fixaci. Po odstranění supernatantu byly koule (nyní na sobě navazující fragmenty naší požadované délky) znovu přečištěny 190 µl ethanolu, následně resuspendovány ve 26 µl elučního pufru (10mM Tris-HCl, pH 8,0) a 2 minuty inkubovány. Poté bylo k 23 µl čistého supernatantu připipetováno 25 µl KAPA HiFi HotStart Ready Mix a ke každému vzorku 2 µl párových indexů, které jsou unikátně kombinovány a následně umožní identifikaci příslušného pacienta.

### 5.2.2.6 PCR

Takto připravený mix byl vložen do cykleru a spuštěna PCR. Podrobný protokol PCR je v Tab. 12.

Tabulka 12 Protokol průběhu PCR			
Fáze PCR	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98	45	1
Denaturace	98	15	6
Annealing	65	30	
Elongace	72	30	
Konečná elongace	72	300	1
	4	∞	

Po ukončení PCR amplifikace byla reakce pročištěna ethanolem. Po vypaření zbytku alkoholu bylo přidáno 52 µl vody. Plato bylo následně umístěno na magnet a 50 µl čistého supernatantu, nyní obsahujícího namnoženou cílovou DNA, přeneseno do čisté 0,2ml zkumavky. 2 µl každého vzorku bylo použito ke změření koncentrace DNA pomocí fluorometru Qubit<sup>TM</sup>.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> [1](#) The Qubit® 2.0 Fluorometr umožňuje přesnou kvantifikaci DNA, RNA a proteinů s využitím specifického fluorescenčního značení. Uvedený protokol přípravy je počítán pro 30 vzorků DNA a uvedené reagentie byly dodány firmou Invitrogen. Nejprve byl připraven Qubit<sup>TM</sup> Working Solution, smícháním Qubit<sup>TM</sup> reagent, v objemu 32 µl a Qubit<sup>TM</sup> pufr v objemu 6 368 µl. Následně bylo v dvou zkumavkách smícháno 190 µl Qubit<sup>TM</sup> Working solution a 10 µl jednotlivých (2) standardů. Do čistých zkumavek byl rozpipetován



### 5.2.2.7 Hybridizace DNA knihovny se sondami

Do nové 1,5ml zkumavky bylo přidáno 5  $\mu$ l 1mg/ml Human COT-1 DNA, 1  $\mu$ g namnožené již ekvimolárně smíchané knihovny DNA a 2  $\mu$ l oligo-block-mixu a tato zkumavka byla ponechána sušit při 60°C po dobu cca 60 minut. Po vyschnutí bylo přidáno 7.5  $\mu$ l 2X Hybridization Buffer a 3  $\mu$ l Hybridization Component A. Poté byl mix denaturován. V posledním kroku byla směs knihovna DNA -COT DNA - oligo bloky přidána do 4,5  $\mu$ l panelu CZECANCA, obsahujícího sondy komplementární k úsekům DNA knihovny, a byla hybridizována 72 hodin při 47°C.

Dle Tab. 13 byly připraveny jednotlivé pufrы, jež jsou součástí SeqCap EZ Hybridization and Wash Kit, vytovřené firmou NimbleGen a byly ponechány před použitím 2 hodiny temperovat.

<b>Tabulka 13</b> Přehled použitých pufrů				
<b>Koncentrovaný pufr</b>	<b>V<sub>pufru</sub> [<math>\mu</math>l]</b>	<b>V<sub>H2O</sub> [<math>\mu</math>l]</b>	<b>V<sub>celk</sub> [<math>\mu</math>l]</b>	<b>T [<math>^{\circ}</math>C]</b>
10X Wash Buffer I	30	270	300	47
10X Wash Buffer II	20	180	200	25
10X Wash Buffer III	20	180	200	25
10X Stringent Wash Buffer	40	360	400	47
2.5X Bead Wash Buffer	200	300	500	25

Streptavidine Dynabeads od firmy Invitrogen byly připravené dle protokolu tak, aby na sebe byly schopné navázat DNA. 15  $\mu$ l hybridizovaných vzorků bylo přidáno ke koulím a řádně propipetováno. Pro navázání DNA ke koulím byla zkumavka umístěna do termocykleru nastaveného na 47°C na 45 minut. Dále byl obsah zkumavky pomocí jednotlivých výše uvedených pufrů, procesem umístění do magnetického stojánu, inkubace a následného odsátí, postupně promýván. Následně bylo ke knihovně přidáno 50  $\mu$ l vody.

### 5.2.2.8 Amplifikace cílové DNA

Posledním krokem přípravy knihovny byla amplifikace již zachycené DNA, navázané na streptavidinové koule. Nejprve byl připraven mix obsahující 50  $\mu$ l KAPA HiFi HotStart

---

Qubit<sup>TM</sup> Working solution v objemu 198  $\mu$ l a ke každému bylo přidáno 2  $\mu$ l vzorku. Koncentrace byla měřena na přístroji podle manuálu.

Ready mix, 10 µl Post-LM-PCR Oligos. Amplifikace probíhala dle protokolu uvedeného v Tab. 14.

<b>Tabulka 14</b> Protokol průběhu PCR			
<b>Fáze PCR</b>	<b>Teplota [°C]</b>	<b>Čas [s]</b>	<b>Počet cyklů</b>
Vstupní denaturace	98	45	1
Denaturace	98	15	11
Anneling	60	40	
Elongace	72	30	
Závěrečná elongace	72	60	1

Nakonec byla knihovna ještě přečištěna pomocí AMPure Beads a 80% ethanolu. DNA byla resuspendována v 50 µl vody. Takto připravené knihovně byla ještě změřena koncentrace pomocí Qubit<sup>TM</sup>. Samotná sekvenace probíhala na systému MiSeq, platforma Illumina.

### 5.2.3 Bioinformatické zpracování získaných dat

Prvním krokem bioinformatické analýzy je namapování všech readů na referenční genom, tedy nalezení pokaždé té části referenční sekvence, která odpovídá sekvenci fragmentu. Namapované sekvence je možno převést do grafické podoby pomocí různých programových nástrojů (např. Integrative Genomic Viewer; IGV), které ukazují sekvenační pokrytí zobrazeného úseku referenční sekvence, identifikovanou sekvenci i výskyt přítomných sekvenčních variant. V dalším kroku je potřeba nalézt a spočítat všechny odlišnosti nasekvenované DNA od referenční sekvence či rozdíly mezi jednotlivými ready mapovanými na stejnou oblast genomu. Na základě pokročilých statistických výpočtů je určena pravděpodobnost, s jakou se na pozicích vyskytují skutečné polymorfizmy a s jakou pravděpodobností jde jen o chyby v sekvenaci či v mapování readů. V případě cíleného sekvenování v diagnostice je požadovaným výstupem často pouze informace o přítomnosti či nepřítomnosti známých variant, ve výzkumu jsou data o variantách dále zpracovávána (Krejčí et al., 2015).

### 5.2.4 Konfirmace variant

Pro potvrzení přítomnosti patogenní varianty bylo použito Sangerovo sekvenování. Nejprve byla provedena PCR dle protokolu uvedeného níže v Tab. 15.

Tabulka 15 Reagencie pro průběh PCR	
Reagencie	1xV [μl]
H <sub>2</sub> O	7,52
10x buffer	1
Primer F	0,1
Primer R	0,1
FastStart Taq polymeráza	0,08
DNA (0,1ng/μl)	1
Celkový objem reakce	10

Takto připravená reakce byla vložena do cykleru s nastaveným programem uvedeným v Tab. 16.

Tabulka 16 Protokol průběhu PCR			
Fáze PCR	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Počáteční	95	300	1
Denaturace	95	30	40
Annealing	60	30	
Elongace	72	300	
Konečná elongace	72	420	1
	20	∞	

Vzniklý amplikon byl ověřen pomocí elektroforézy, přečištěn od zbylých primerů a přidán do reakce pro sekvenování. Kompletní získané sekvence jsou součástí příloh.

## 5.3 HRM analýza zárodečných mutací v genech *CYP3A5* a *CPY1A2*

High resolution melting (HRM) analýza je metoda určená k detekci jednonukleotidových záměn (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) či krátkých inzercí a delecí. Je založena na principu analýzy křivek tání, prováděné na dvouřetězcových úsecích DNA, do kterých jsou zakomponována interkalační barviva (v našem případě bylo barvivo již součástí kitu 5 x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix, (Solis BioDyne). Jako vstupní materiál pro HRM analýzu je používán produkt polymerázové řetězové reakce (PCR) pokrývající vyšetřovanou oblast DNA obvykle o velikosti 100-300 bp.

Analýza dvou kandidátních variant – c. 92dupG., p.G31fs v genu *CYP3A5* (OMIM 605325) a c.816T>A, p.Y272\*. v genu *CYP1A2* (OMIM 124060) byla provedena na přístroji LC480 (Roche) v 384 - jamkovém formátu, což umožnilo analýzu křivek tání PCR produktů navazující bezprostředně na amplifikační krok. Vyšetření bylo provedeno na úrovni zárodečné DNA izolované z leukocytů periferní nesrážlivé krve na rozšířeném souboru 1033 pacientů a celkem 662 kontrol.

### 5.3.1 PCR amplifikace cílových oblastí DNA

Oblasti pokrývající vyšetřované varianty byly amplifikovány za využití specifických primerů metodou PCR pomocí 5 x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix kitu, (Solis BioDyne) umožňujícím i následnou HRM analýzu.

Sekvenčně specifické primery (GeneriBiotech) byly navrženy tak, aby jejich predikovaná hybridizační teplota byla podobná a velikost PCR produktů byla vhodná jak pro HRM analýzu, tak pro následnou kontrolu Sangerovým sekvenováním. Primery byly firmou dodány ve vysušeném stavu, naředěny čistou vodou na koncentraci 0,1mM. Z tohoto zásobního roztoku bylo odebráno 30 µl a znovu naředěno 70 µl H<sub>2</sub>O na výslednou koncentraci pracovního primeru (c)= 0,03mM. Primery byly uchovány v mrazu. Přehled primerů je uveden v Tab. 17. Variantní oblast byla lokalizována přibližně do střední části amplikonu. Přesná sekvence sledovaných úseků je uvedena níže (Obr. 10).

**Obrázek 10** Sekvence testované oblasti exonu 2, genu *CYP3A5*, transkripční varianty [NM\\_000777.4](#). (nahore) a testované oblasti exonu 2, genu *CYP1A2*, transkripční varianty [NM\\_000761.3](#) (dole). Velkými písmeny je vyznačena kódující oblast. Kódované aminokyseliny jsou uvedeny nad samotnou sekvencí modrým písmem. Primery jsou zvýrazněny žlutě, místo sledované mutace je podbarveno modře.

```

3721 cctccctctcttgaccattccagttcctgagtaactcaccagccctctgatctataaagt
    25                               Y G T R T H G
3781 cacaatccctgtgacctgattttctgtttcactttgtagATATGGGACCCGTACACATGGA
    32 L F K R L G I P G P T P L P L L G N V L
3841 CTTTTTAAGAGACTGGGAATCCAGGGCCACACCTCTGCCTTTGTTGGGAAATGTTTG
    52 S Y R Q
3901 TCCTATCGTCAGgtgagttgcttgagcttctcttttgccttcttatggttgcaaacatca
3961 gcttagttccatcagtaaaaatgccccctcttgaggaggagttctgaggtttcacatctt

    223 T H E F V E T A S S G N P L D F F P I L
1561 ACACTCATGAGTTCGTGGAGACTGCCTCCTCCGGGAACCCCTGGACTTCTTCCCCATCC
    243 R Y L P N P A L Q R F K A F N Q R F L W
1621 TTCGCTACCTGCCTAACCTGCCTGCAGAGGTTCAAGGCCTTCAACCAGAGGTTCTGT
    263 F L Q K T V Q E H Y Q D F D K
1681 GGTTTCCTGCAGAAAACAGTCCAGGACCTATCAGGACTTTGACAAGgtgagccccgggt
1741 gcaggtggcaaggggcaacctgcagggcctgggtgcagccccctccctcccagctccagca

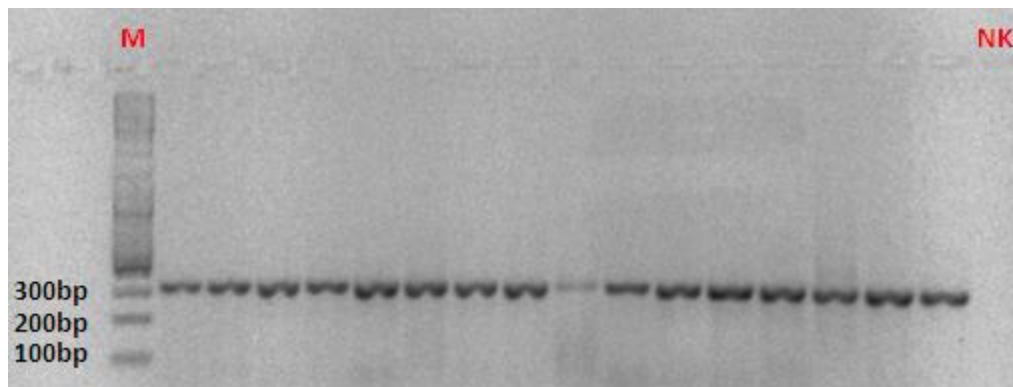
```

Tabulka 17 Přehled primerů a jejich sekvence				
Gen	Název	Sekvence primeru	Délka	Anelační T [°C]
<i>CYP3A5</i>	CYP3A5_e2F	5'-ctccctctcttgaccattccag-3'	248	55,9
	CYP3A5_e2R	5'-aacctcagaactccctccca-3'		56,1
<i>CYP1A2</i>	CYP1A2_e2F	5'-tccttgcctacctgcctaac-3'	118	55,6
	CYP1A2_e2R2	5'-ccagccctgcaaggtg-3'		57,2

### 5.3.2 Optimalizace PCR

Optimalizovaná PCR i následná HRM analýza byla provedena v celkovém reakčním objemu 3 µl na reakci, s využitím cca 0,24 ng templátové DNA. Při každé analýze byla pro oba vyšetřované fragmenty provedena negativní kontrola (NK - bez obsahu teplátové DNA) i kontrola pozitivní (PK - obsahující DNA s mutantní variantou v heterozygotním stavu). Specifičnost reakcí byla v rámci optimalizace ověřena kontrolní elektroforézou PCR produktů (Obr. 11). Pro elektroforézu byl použit 1,5% agarózový gel. Ke každému vzorku PCR bylo přidáno 5 µl H<sub>2</sub>O a 1,2 µl Loading Dye DNA. Vzorky byly nanášeny o objemu 3 µl. Po nanesení všech vzorků byla do analýzy zařazena také jedna negativní kontrola. Elektroforéza probíhala při napětí 72V po dobu 45 minut.

**Obrázek 11** Elektroforetická detekce vzorků vyšetřovaného genu *CYP3A5*, exonu 2, vybraného fragmentu u vybraných pacientů. Tmavé proužky zobrazují přítomnost amplifikovaného produktu o délce cca 250-300 bp. V posledním sloupci je umístěna negativní kontrola.



Po elektroforetické detekci byla připravena PCR reakce podle Tab. 18.

<b>Tabulka 18</b> Reakční mix k provedení PCR a HRM analýzy	
<i>CYP3A5</i> , <i>CYP3A5</i>	
Reagencie	200xV [ $\mu$ l]
Solis EvaGreen HRM mix	120
P <sub>for</sub>	3
P <sub>rev</sub>	3
ddH <sub>2</sub> O	454
DNA (1xV)	0,24
Celkový objem reakce (1xV)	3

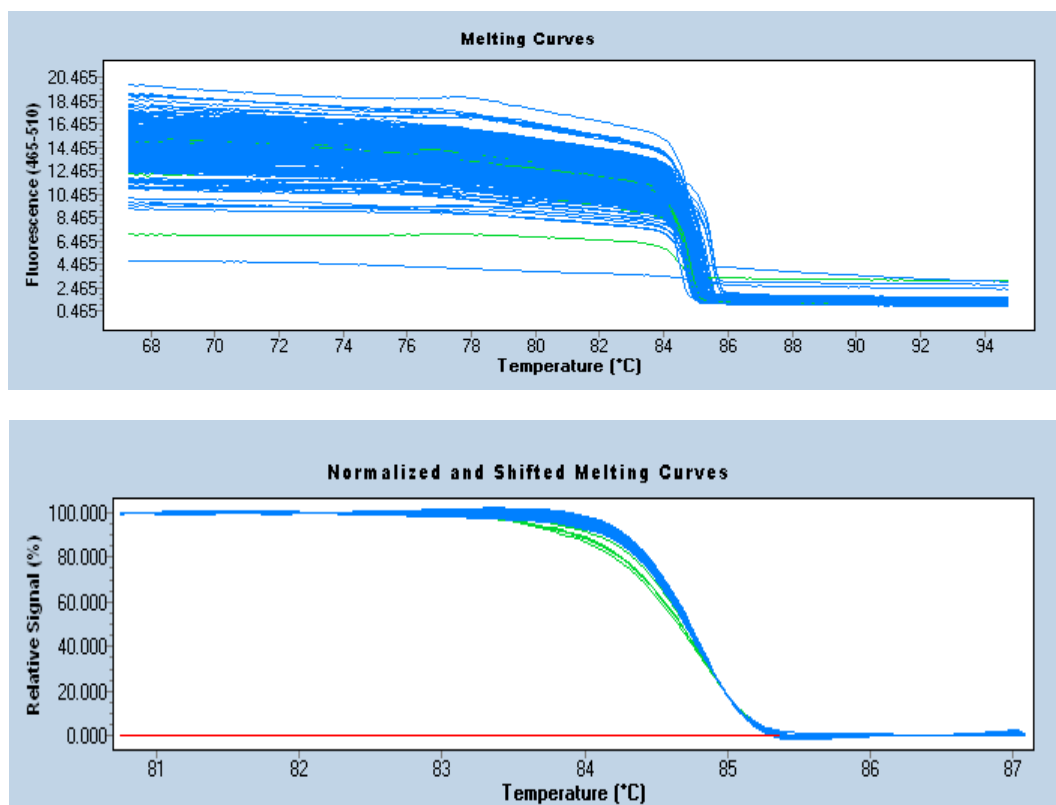
Níže v Tab 19 jr uveden protokol průběhu reakce.

<b>Tabulka 19</b> Protokol průběhu PCR reakce na přístroji LightCycler 480, Roche			
Fáze PCR	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Pre-inkubace	95	900	1
Denaturace	95	25	45
Annealing	60	30	
Elongace	72	20	

### 5.3.3 HRM analýza

Při postupném zvyšování teploty dochází k rozpadu dvouřetězců DNA což je doprovázeno postupně se snižující fluorescencí. Proces je pečlivě snímán a zaznamenán vysokorozlišovací kamerou a následně softwarem převeden do grafické podoby, známé jako křivka tání – křivka závislosti intenzity fluorescence na zvyšující se teplotě. Grafické schéma průběhu analýzy je znázorněno na Obr. 12.

**Obrázek 12** Křivka tání před normalizací (nahore) a normalizovaná křivka tání (dole) – modře jsou vyznačeny wild type varianty, zeleně suspektní varianty. Červená křivka reprezentuje negativní kontrolu.



Metoda HRM analýzy nijak nezhodnocuje vyšetřený vzorek a tento je poté možné (v případě podezření na výskyt patogenní varianty) použít na konfirmační vyšetření např. Sangerovým sekvenováním.

### 5.3.4 Konfirmace nalezených variant

Pro potvrzení nalezených variant byla zvolena metoda sekvenování podle Sangera. Po ukončení HRM a vyhodnocení dat byl připraven mix reagensií na sekvenační reakci, dle protokolu uvedeného v Tab. 20. K sekvenační reakci byl použit BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit vyrobený firmou Applied Biosystems a též přidán sekvenační pufr. Hotový mix sekvenační reakce byl posléze vložen do cykleru v němž byl nastaven odpovídající program.

<b>Tabulka 20</b> Reakční mix k provedení sekvenační reakce	
<i>CYP3A5, CYP1A2</i>	
<b>Reagencie</b>	<b>1xV [<math>\mu</math>l]</b>
BDbuffer	1.0
BDT	0.4
Primer	0.2
ddH <sub>2</sub> O	3.0
PCR	0.6
Celkový objem reakce	5

Po proběhnutí sekvenační reakce bylo zapotřebí před samotným sekvenováním provést přečištění a přesrážení (precipitaci) sekvenačních produktů octanem sodným (NaOAc) a ethanol. Při objemu sekvenační reakce 5  $\mu$ l bylo přidáno 1,3  $\mu$ l 3M NaOAc , 30  $\mu$ l 100% EtOH a 1,3  $\mu$ l EDTA. Plato obsahující všechny reagencie bylo 15 sekund vortexováno a centrifugováno při 3000ot/min, po dobu 20 minut a teplotě 4°C. Ethanol byl odstraněn a bylo připipetováno 50  $\mu$ l 70% EtOH, znovu (bez vortexování) byla centrifuga nastavena na 300ot/min, 20 minut, 4°C a plato centrifugováno. Po odstranění ethanolu se plato sušilo v cykleru, po dobu 4 minut a při teplotě 90°C. Jako poslední reagencie bylo přidáno 12  $\mu$ l formamidu, a vzorky byly při teplotě 95°C, 2 minuty denaturovány.

Sekvenace probíhala v sekvenátoru firmy Applied Biosystems, série 3130 – ABI3130, předem nastaveného na dobu nástřiku 15 sekund a dobu jednoho runu 1400 sekund. Výsledné chromatogramy s nalezenými variantami jsou uvedeny v sekci výsledky (6.2).



## 6 Výsledky

První část (6.1) obsahuje výsledky analýzy genů asociovaných s karcinomem prsu prováděných pomocí NGS na platformě Illumina. Vyšetřeno bylo celkem 263 pacientů a 317 nenádorových kontrol. Podrobná charakteristika vyšetřovaného souboru je uvedena v sekci Materiály a metody (5.1; Tab. 5).

Ve druhé části (6.2) jsou uvedeny získané výsledky HRM analýzy a konfirmace Sangerovým sekvenováním pro gen

a) *CYP3A5*

b) *CYP1A2*

Obě HRM analýzy byly provedeny na souboru 1033 pacientů a 662 kontrol, viz kapitola 5.1, Tab. 6. Analyzovány byly exony 2 v genech *CYP3A5* (přednostně pro variantu c.92dupG) a *CYP1A2* (přednostně pro variantu c.816T>A). Kompletní získaná data jsou uvedena na konci textu v Příloze 4.

### 6.1 Analýza genů pomocí NGS

V souboru 263 pacientů a 317 kontrol bylo sekvenováním exonů a přilehlých intronových oblastí vybraných 219 genů získáno 85 069 variant (40 280 u pacientů a 44 789 u kontrol). Z tohoto souboru již byly odstraněny varianty s pokrytím nižším než 100 a s frekvencí výskytu v populaci vyšší než 1 %, čímž bylo zajištěno ponechání pouze raritních, potenciálně poškozujících, variant. Ze souboru byly dále na základě kontroly nalezených mutací v IGV odstraněny sekvenační nepřesnosti. Celkový profiltrovaný soubor čítal 45 753 nalezených variant (21 713 u pacientů, 24 040 u kontrol). Nalezeno bylo 5 550 unikátních variant v 219 genech, 146 variant bylo truncačních (inzerce/delece posunující čtecí rámec, mutace zařazující předčasně stop kodón (stopgain SNV), mutace oddalující zařazení stop kodónu (stoploss SNV)), z toho 100 variant bylo unikátních v 57/219 genech. Vyšetřený soubor nenádorových kontrol obsahoval jednu velkou duplikaci v genu *MSH6* a jednu velkou delecii v genu *rb1*. Přehled všech nalezených variant v souboru je uveden v Tab. 21.

<b>Tabulka 21</b> Souhrn všech nalezených variant		
<b>Typ varianty</b>	<b>Pacienti (N=21714)</b>	<b>Kontroly (N=24040)</b>
<b>Intronové</b>	16233	18489
<b>Sestřihové</b>	929	763
<b>Exonové</b>	4550	4786
<b>Synonymní</b>	2262	2312
<b>Nesynonymní</b>	2184	2384
<b>Posunové nonfs</b>	17	31
<b>Posunové</b>	49	22
<b>Stopgain</b>	38	36
<b>Stoploss</b>	0	1
<b>Velká delece</b>	0	1
<b>Velká duplikace</b>	0	1

Analýza byla zaměřena hlavně na varianty truncační, tedy mutace měnící čtecí rámec či mutace předčasně zařazující stop kodón. U pacientů bylo posunových mutací nalezeno 49, stopgain alterací 38. U kontrol posunových mutací bylo identifikováno 22, stopgain SNV 36 a 1 stoploss SNV. Celkem byly truncační varianty identifikovány u 73/263 pacientů s diagnózou karcinomu prsu a u 53/317 kontrol.

### 6.1.1 Nalezené varianty v genech prokazatelně asociovaných s C50

Mezi geny, u nichž je příčinná mutace prokazatelně asociována se vznikem karcinomu prsu (dále jako „A“ skupina genů) patří *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *CHEK2*, *NBN*, *NF1*, *PALB*, *PTEN*, *STK11*, *TP53*, většina z nich se uplatňuje v reparaci dvouvláknových zlomů DNA. Celkové počty nalezených variant jsou uvedeny v Tab. 22. Celkem tedy bylo u pacientů identifikováno 37 truncačních variant. V případě pacientů se jednalo o 33/263 (12,5%) pacientů s přítomností jedné trunkace, u 2/263 (0,8%) pacientů byly nalezeny trunkace dvě, pokaždé v genech *BRCA2* a *NBN*. V kontrolní populaci bylo nalezeno celkem 9/317 (2,8%) unikátních trunkací u 9 kontrol.

<b>Tabulka 22</b> Souhrn všech nalezených variant v „A“ skupině genů		
<b>Typ varianty</b>	<b>Pacienti (N=958)</b>	<b>Kontroly(N=1084)</b>
<b>Intronové</b>	648	793
<b>Sestřihové</b>	22	15
<b>Exonové</b>	288	276
<b>Synonymní</b>	88	107
<b>Nesynonymní</b>	163	159
<b>Inzerce nonfs</b>	0	1
<b>Posunové</b>	26	4
<b>Stopgain</b>	11	5

Z tohoto souboru variant dále byly vybrány takové, jež jsou v databázi ClinVar vedené jako patogenní. Souhrn těchto variant je uveden v Tab. 23.

<b>Tabulka 23</b> Patogenní varianty v „A“ genech dle ClinVar		
<b>Typ varianty</b>	<b>Pacienti (N=38)</b>	<b>Kontroly (N=6)</b>
<b>Sestřihové</b>	4	0
<b>Exonové</b>	34	6
<b>Nesynonymní</b>	4	1
<b>Posunové</b>	24	3
<b>Stopgain</b>	6	2

Kompletní informace o nalezených patogenních variantách v genech „A“ skupiny jsou uvedeny v Tab. 24.

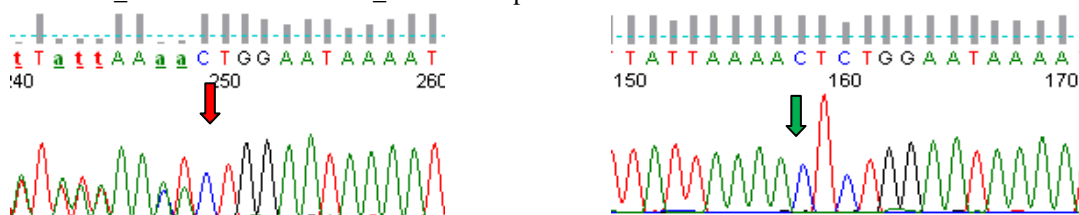
<b>Tabulka 24</b> Seznam nalezených patogenních variant						
<b>Gen</b>	<b>dle HGVS</b>	<b>protein HGVS</b>	<b>rs Number</b>	<b>P(N)</b>	<b>C(N)</b>	<b>p-hodnota*</b>
<b>ATM</b>	c.1447_1448delCT	p.L483fs	.	1	0	0,662
	c.3801delG	p.E1267fs	.	1	0	
	c.3849delA	p.L1283fs	.	0	1	
	c.4196dupC	p.T1399fs	.	0	1	
	c.6100C>T	p.R2034X	.	1	0	
<b>BRCA1</b>	c.5266dupC	p.Q1756fs	.	5	0	<0,001
	c.3700_3704delGTAAA	p.V1234Qfs	rs80357609	1	0	
	c.1687C>T	p.Q563*	rs80356898	1	0	
	c.303T>G	p.Y101*	rs80356936	1	0	
	c.213-12A>G	.	rs80358163	1		
	c.181T>G	p.C61G	rs28897672	1	0	
<b>BRCA2</b>	c.304dupA	p.F101fs	.	1	0	0,018
	c.2517C>A	p.Y839*	rs80358516	1	0	
	c.4874dupA	p.E1625fs	.	1	0	
	c.5682C>G	p.Y1894*	rs41293497	1	0	
	c.6402_6406delCTTAA	p.N2135fs	rs80359584	1	0	
	c.6753dupT	p.H2251fs	.	1	0	
<b>CHEK2</b>	c.1180G>A	p.E394K		1	0	0,013
	c.1100delC	p.T367fs	.	3	0	
	c.520C>G	p.L174V		1	0	
	c.A349G	p.R117G	rs28909982	1	0	
	c.846+4_846+7delAGTA	p.D265_H282del	rs764884641	2	0	
	c.444+1G>A	.	rs121908698	1		
	c.190G>A	p.E64K	rs141568342	0	1	
<b>NBN</b>	c.1393A>T	p.K465*	.	0	1	0,333
	c.657_661delACAAA	p.K219fs	.	3	0	
	c.93_94del	p.A32fs	.	1	0	
<b>PALB2</b>	c.3494C>A	p.S1165*	.	0	1	0,149
	c.3256C>T	p.R1086*	.	1	0	
	c.1227_1231delTGTTA	p.Y409fs	.	1	0	
	c.509_510delGA	p.R170fs	.	2	0	
	c.172_175delTTGT	p.Q60fs	rs180177143	2	0	
	c.93dupA	p.L32fs	.	0	1	

\*Pozn. : p – hodnoty jsou stanoveny pro celý gen.

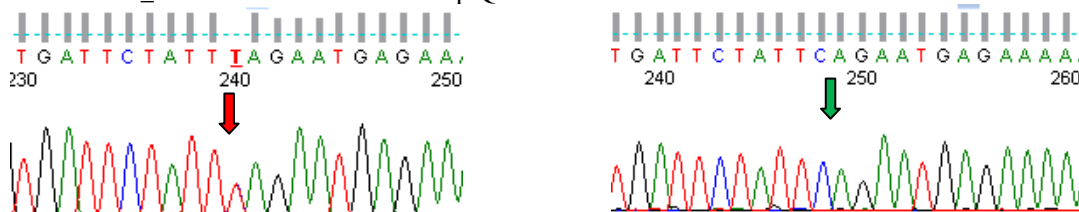
Počty těchto nalezených a potvrzených patogenních variant jsou více markantní u pacientů splňujících indikační kritéria, kde byla přítomnost příčinné varianty potvrzena v 21/89 (23,6%) případů, proti pacientům indikační kritéria nesplňujícím, kde byla patogenní varianta identifikována u 14/174 (8,1%) pacientů. Všechny alterace uvedené v Tab. 24 byly potvrzeny metodou Sangerova sekvenování. Ilustrativní sekvence jsou uvedeny níže na Obr. 13, kompletní výsledky sekvenování jsou uvedené v sekci přílohy.

**Obrázek 13** Potvrzení nalezené varianty Sangerovým sekvenováním.

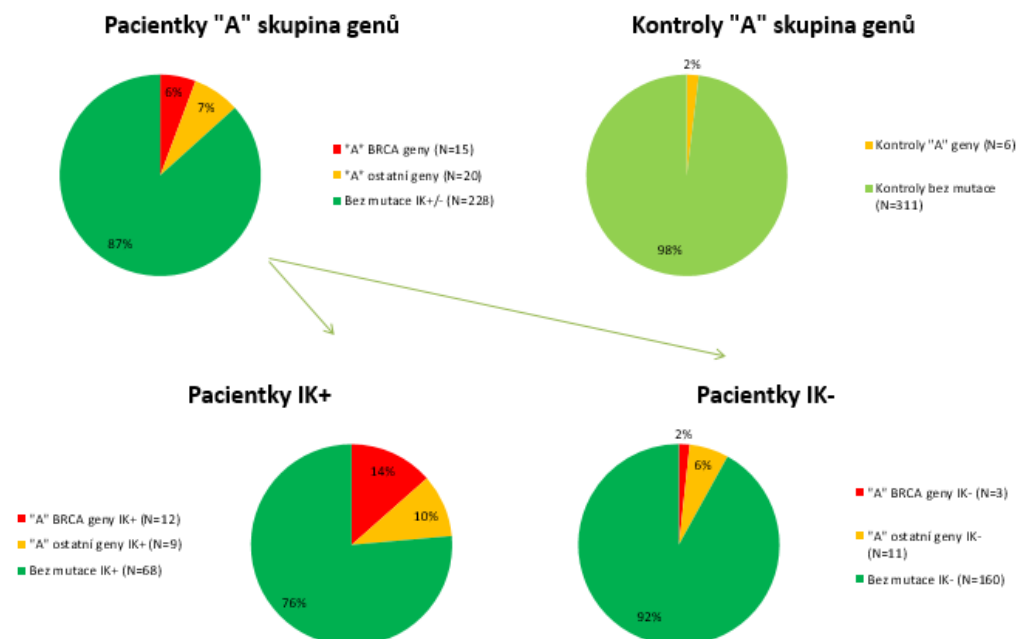
*ATM*:NM\_000051:exon10:c.1447\_1448delCT:p.L483fs



*BRCA1*:NM\_007294:exon10:c.1687C>T:p.Q563\*



**Obrázek 14** Grafy zobrazují poměr nalezených mutací u pacientů s diagnózou C50 a kontrol. Skupina „A“ genů je zde ještě rozdělena na geny *BRCA1,2* (červeně) a ostatní geny skupiny „A“ (oranžově). Pacienti jsou dále rozděleni na ty, kteří indikační kritéria splňují a ty, kteří je nesplňují.



## 6.1.2 Nalezené varianty v genech zvyšujících riziko vzniku C56

Do skupiny genů dosud asociovaných s dědičným karcinomem vaječníků (dále „B“ skupina genů) dle NCCN doporučení patří geny *BRIP1*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *RAD51C* a *RAD51D*. Mezi těmito geny bylo v souboru pacientek s neselektovaným karcinomem prsu identifikováno celkově 568 variant (285 unikátních), u pacientů 254 (162 unikátních), 314 variant u kontrol. V této skupině vyšetřovaných genů byly nalezeny trunkační varianty u 4/263 (1,5%) pacientů a 2/317 (0,6%) kontrol. V souboru pacientů byly identifikovány tři patogenní mutace v genu *RAD51C* a jedna v genu *MSH6*, v souboru kontrol poté dvě patogenní mutace v *MSH6* a žádná v *RAD51C*. Všechny nalezené varianty jsou uvedeny v Tab. 25.

Tabulka 25 Souhrn nalezených variant v „B“ skupině genů		
Typ varianty	Pacienti (N=254)	Kontroly (N=314)
Intronové	150	182
Sestřihové	16	21
Exonové	88	110
Synonymní	24	76
Nesynonymní	60	33
Posunové	1	1
Stopgain	3	0
Velká duplikace <i>MSH6</i>	0	1

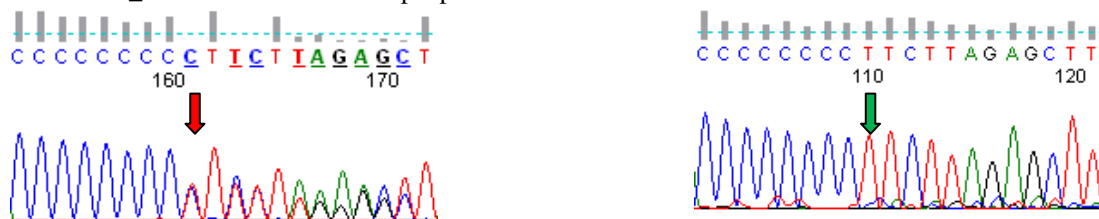
Varianty identifikované jako poškozující jsou uvedeny v Tab. 26.

Tabulka 26 Seznam nalezených patogenních variant v „B“ skupině genů						
Gen	dle HGVS	protein HGVS	rs number	P(N)	C(N)	p-hodnota *
<i>MSH6</i>	c.3261dupC	p.F1088fs	rs 587782425	1	0	1
	c.4082_4083insGACT	p.*1361delins*	.	0	1	
	Duplikace celého genu		.	0	1	
<i>RAD51C</i>	c.502A>T	p.R168*	rs 587871490	2	0	0,092
	c.664C>T	p.Q222*	.	1	0	
*Pozn.: p – hodnoty jsou zde stanoveny pro celý gen						

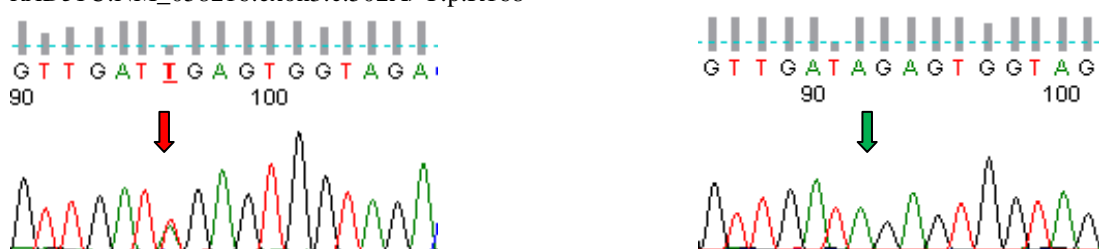
Nalezené suspektní varianty potvrzené Sangerovým sekvenováním jsou ilustrativně znázorněny níže na Obr. 15. Mutantní genotyp je uveden vždy vlevo, k němu odpovídající wild type genotyp vpravo. Kompletní získaná data jsou uvedena na konci textu v přílohách.

**Obrázek 15** Potvrzení nalezené varianty Sangerovým sekvenováním. Mutantní fenotyp uveden v pravo, wild type poté vlevo. Místo mutace je zvýrazněno šípkami.

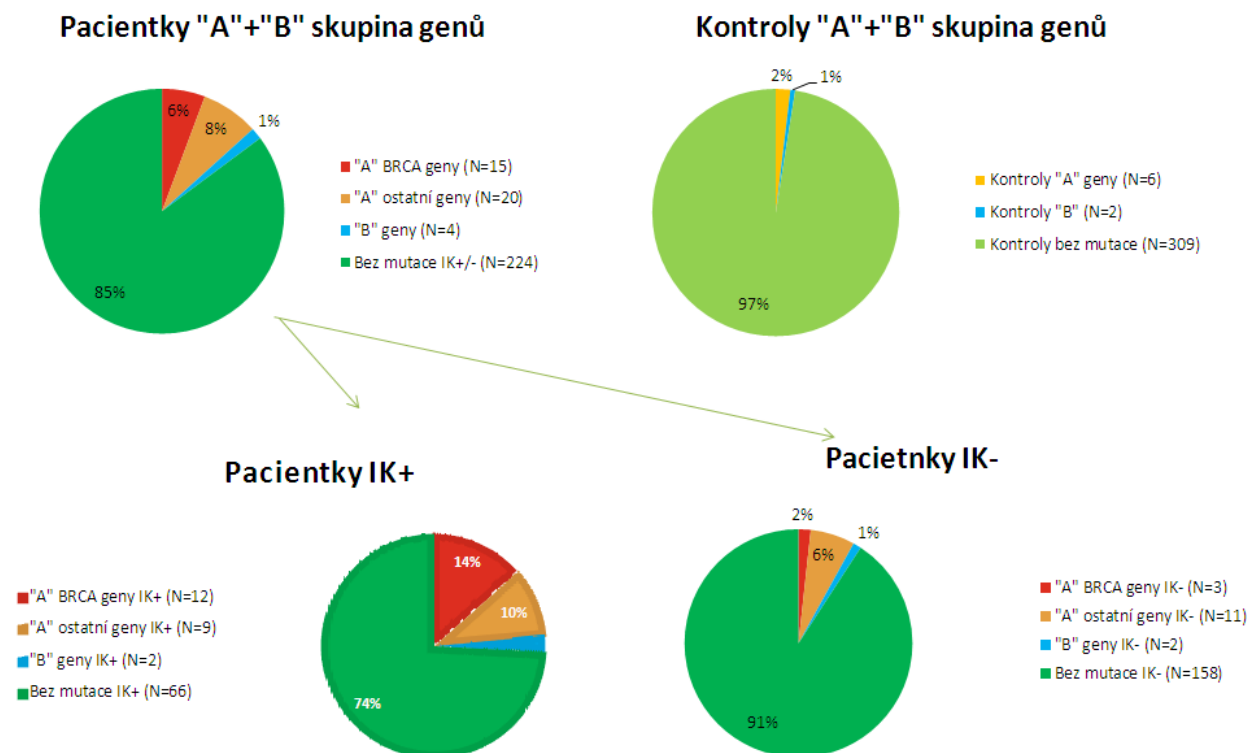
*MSH6*:NM\_000179:exon5:c.3254dupC:p.T1085fs



*RAD51C*:NM\_058216:exon3:c.502A>T:p.R168\*



**Obrázek 16** Zobrazený poměr nalezených vysoce penetrantních mutací u pacientů s diagnózou C50 a také kontrol u „A“ genů a „B“ genů.



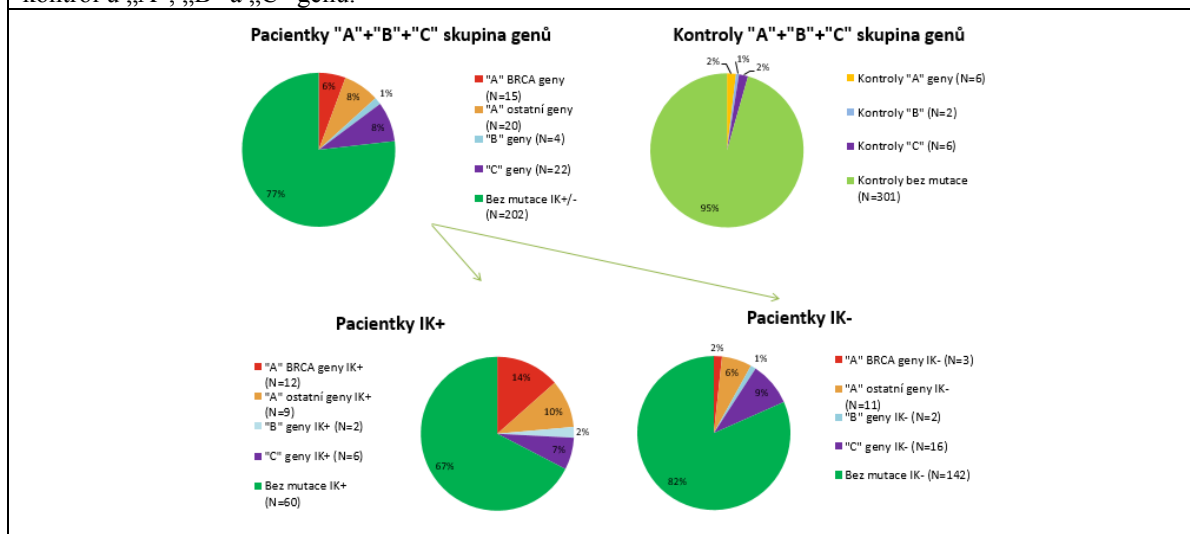
### 6.1.3 Analýza dalších kandidátních predispozičních genů

Třetí skupinu genů (dále „C“ skupinu) tvoří geny méně klinicky relevantní, u kterých byly také nalezeny patogenní varianty asociující s hereditárním karcinomem prsu, ačkoliv jejich penetrance je ve srovnání s geny „A“ skupiny a „B“ skupiny nižší. Kompletní počty variant nalezených v těchto genech je uveden níže v Tab. 27.

Tabulka 27 Souhrn nalezených variant ve skupině genů „C“		
Typ varianty	Pacienti (N=20 501)	Kontroly (N=22 642)
Intronové	15436	17 514
Sestřihové	891	727
Exonové	4174	4400
Synonymní	2150	2172
Nesynonymní	1961	2149
Posunové	22	17
Inzerce nonfs	17	30
Stopgain	24	31
Stoploss	0	1
Velká delece	0	1

V souboru nalezených variant této skupiny genů byly ponechány geny s variantami v exonech, jež měnily čtecí rámec či způsobovaly zařazení stop kodónu a zároveň se vyskytovaly alespoň u jednoho pacienta. Následně byly ze souboru kontrol vybrány ty, jež měly přítomnou variantu v již předem vybraných genech. Takto vyfiltrovaný soubor poté obsahoval 22/263 (6,8 %) pacientů (u dvou pacientů byla nalezena ještě patogenní varianta ve více klinicky relevantních genech *NBN* a *BRCA1*, jedna pacientka je nosičkou mutací v genech *ERCC6* a zároveň *RNF168*) a 6/317 (0,02 %) kontrol. Přehled nalezených kandidátních variant je uveden v Tab 28.

**Obrázek 17** Zobrazený poměr nalezených vysoce penetrantních mutací u pacientů s diagnózou c50 a také kontrol u „A“, „B“ a „C“ genů.



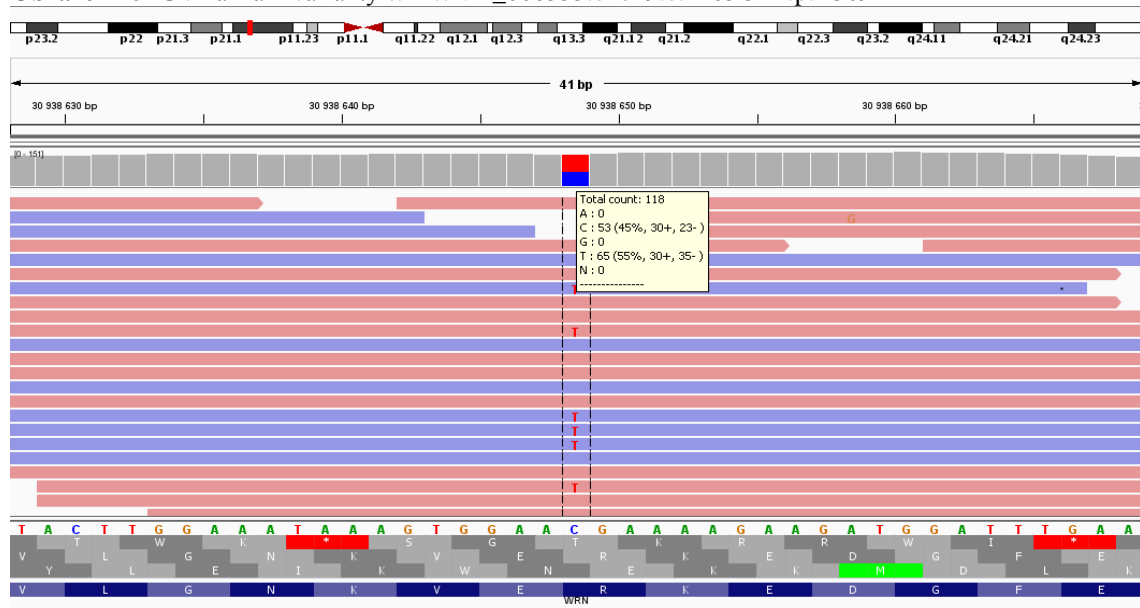
Z grafů vyobrazených výše vyplývá očekávaný závěr, a sice že záchytnost mutací u pacientek splňující indikační kritéria je signifikantně vyšší a převyšuje 10%. Je zde ovšem také celkem vysoké procento pacientek, u kterých byla nalezena patogenní mutace v jednom z predispozičních genů, která indikační kritéria nesplňují. Tyto pacientky by tedy v současné době nebyly geneticky testovány, a tudíž by genetická složka jejich onemocnění nebyla odhalena.

<b>Tabulka 28</b> Seznam nalezených potenciálně patogenních variant ve skupině „C“						
<b>Gen</b>	<b>dle HGVS</b>	<b>protein HGVS</b>	<b>rs number</b>	<b>P(N)</b>	<b>C(N)*</b>	<b>p-hodnota**</b>
<b>CASP8</b>	c.1402_1403delTG	p.468_468del	.	1	0	0,45
<b>ERCC1</b>	c.875G>A	p.W292*	rs116640350	1	0	0,45
<b>ERCC2</b>	c.1703_1704delAA	p.568_568del	.	1	1	1
<b>ERCC5</b>	c.2423delC	p.T808fs	.	1	0	0,45
<b>ERCC6</b>	c.2143G>T	p.G715*	.	1	0	0,09
	c.3862C>T	p.R1288*	rs185142838	1	0	
	c.2066_2067delAA	p.689_689del	.	1	0	
<b>FANCF</b>	c.388dupC	p.Q130fs	.	1	0	0,45
<b>FANCG</b>	c.313G>T	p.E105*	rs121434425	1	0	0,45
<b>FANCL</b>	c.1114_1115insATTA	p.T372fs	.	3	2	0,66
<b>FANCM</b>	c.5791C>T	p.R1931*	.	1	0	0,20
	c.3898G>T	p.E1300*	.	1	0	
<b>MSH3</b>	c.1419_1420delAG	p.473_474del	.	1	0	0,45
<b>RAD50</b>	c.2043delC	p.C681fs	.	1	0	1
	c.2157dupA	p.L719fs	.	0	1	
<b>RECQL</b>	c.1859C>G	p.S620*	rs142038240	2	1	0,59
<b>RNF168</b>	c.391C>T	p.R131*	rs201915239	1	0	0,45
<b>WRN</b>	c.1105C>T	p.R369*	rs17847577	1	0	0,20
	c.4216C>T	p.R1406*	rs11574410	1	0	
<b>XPA</b>	c.772_785delGTACAAGTCTTACG	p.258_262del	.	1	0	0,45
<b>XRCC1</b>	c.943G>T	p.E315*	.	0	1	1
<b>XRCC2</b>	c.96delT	p.F32fs	.	1	0	0,45
<b>XRCC5</b>	c.2166dupT	p.G722fs	.	1	0	0,45
<b>ZNF365</b>	c.1065G>a	p.W355*	.	1	0	0,45
*Pozn.: Počet nalezených různých variant v celém daném genu. **Pozn.2: p – hodnoty jsou stanoveny pro celé geny						

Tyto výše uvedené varianty nebyly potvrzovány, jejich přítomnost byla vyhodnocena pomocí programu IGV viewer. Ilustrativní snímek z programu IGV viewer je uveden na Obr. 18.



**Obrázek 18** IGV záznam varianty *WRN*:NM\_000553:exon9:c.1105C>T:p.R369\*

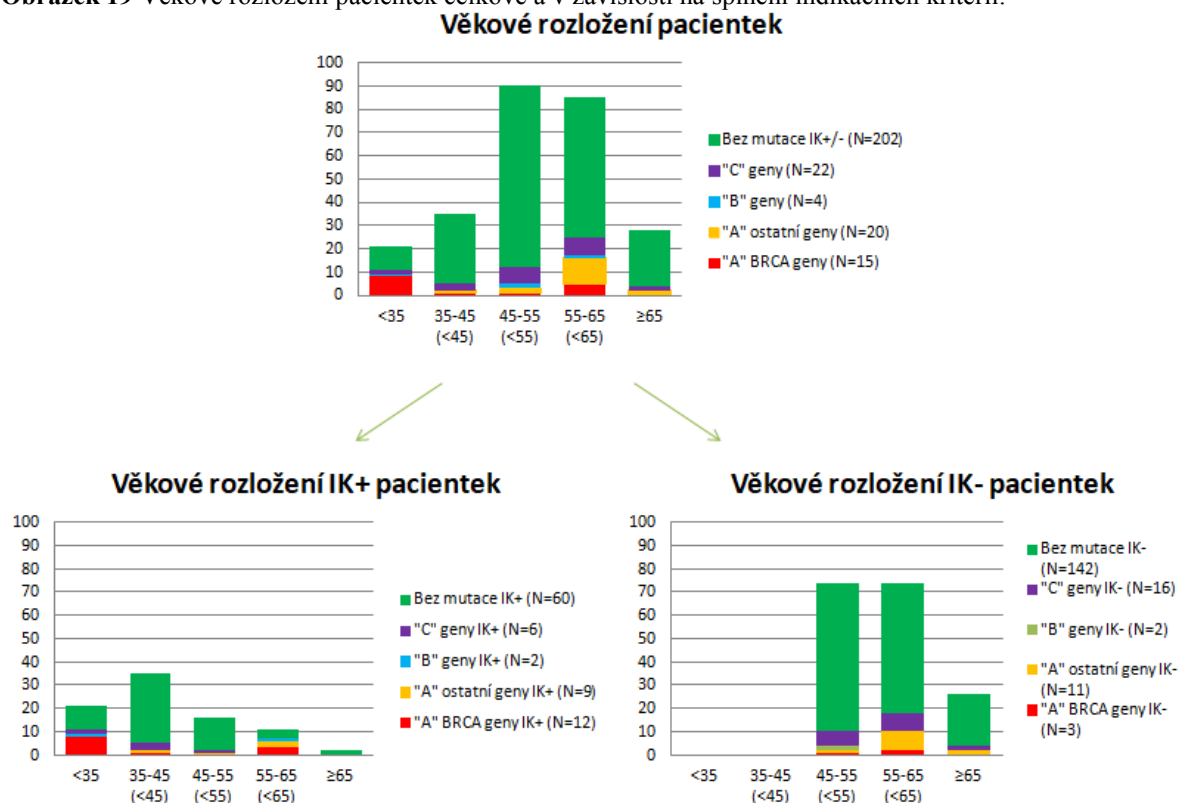


K definitivnímu potvrzení přítomnosti identifikovaných variant bude potřeba tyto osekvenovat Sangerovým sekvenováním.

#### 6.1.4 Obecné charakteristiky vyšetřeného souboru

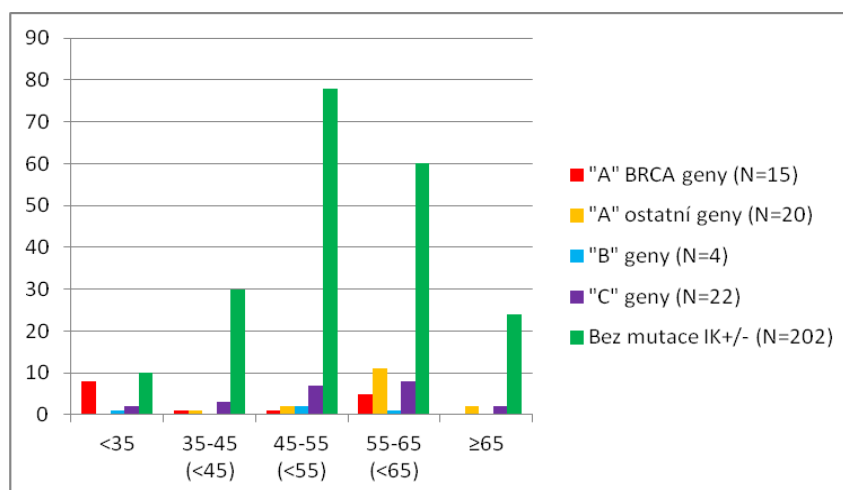
S ohledem na věk (jako jedno z indikačních kritérií) bylo prokázáno, že nejvíce *BRCA*-pozitivních pacientek je u skupiny žen mladších 35 let. Toto, vzhledem k vysoké penetranci mutací v *BRCA1* a *BRCA2* je předpokládáný závěr. Z grafu na Obr. 19 je nadále patrné, že pacientky nesplňující indikační kritéria vyvíjejí karcinomy v pozdějším věku – není zde patrná genetická složka onemocnění a karcinom je tak vyvinut na základě postupné celoživotní akumulace získaných mutací.

**Obrázek 19** Věkové rozložení pacientek celkově a v závislosti na splnění indikačních kritérií.



V souladu s dostupnými demografickými údaji, je nejvíce pacientek s karcinomem prsu ve věku 45-65 let (Obr. 20).

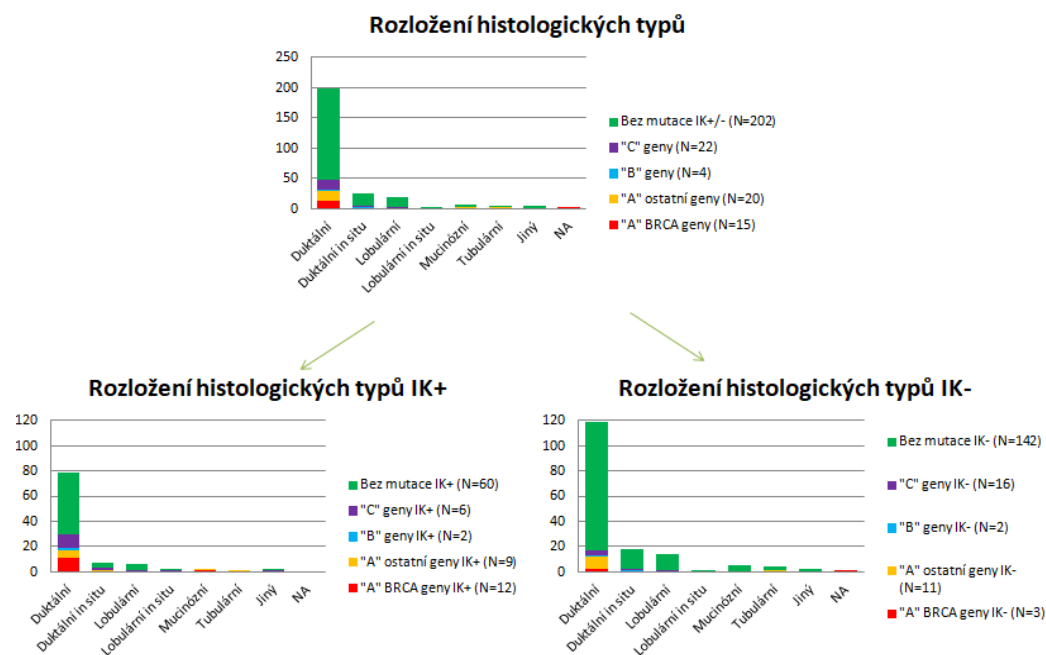
**Obrázek 20** Celkové věkové rozložení počtu případů pacientek s diagnózou C50



Ze získaných údajů dále vyplývá, že u pacientek s dosud známými poškozujícími zárodečnými mutacemi nedochází k manifestaci lobulárního, lobulárního *in situ* typu

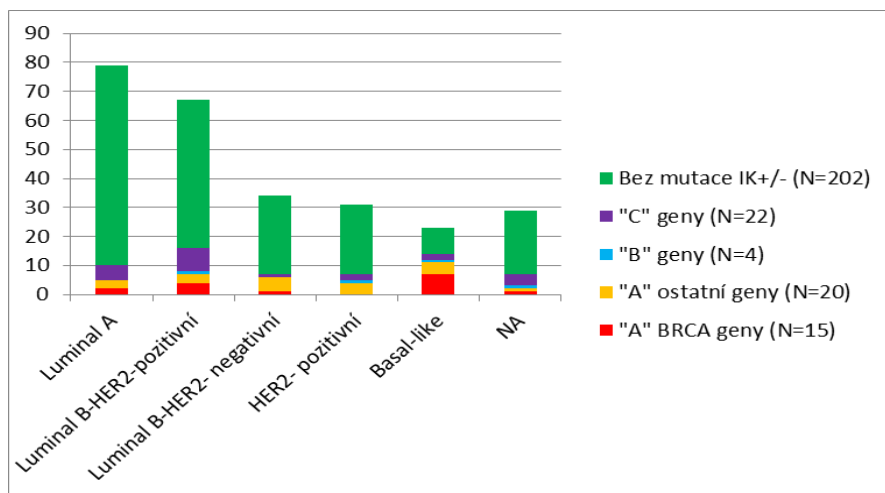
karcinomu. Naproti tomu, běžné jsou u této skupiny pacientek karcinomy duktální, mucinózní a tubulární. Také *BRCA1,2* pozitivní pacientky nevyvíjejí tubulární karcinom (Obr. 21). Pro potvrzení této hypotézy ovšem bude zapotřebí provést analýzu na rozšířeném souboru pacientek.

**Obrázek 21** Rozložení histologických typů karcinomu prsu celkově a v závislosti na splnění indikačních kritérií.



Zajímavá korelace byla zjištěna mezi nosičstvím mutací v genech *BRCA1*, *BRCA2* a imunohistochemickými podtypy C50. Z grafů na Obr. 22 je patrné, že *BRCA1*, *BRCA2* pozitivní pacientky často vyvíjejí triple – negativní (basal – like) karcinom. Naproti tomu nosičky mutací v genech s vysokou penetrancí (mimo geny *BRCA1*, *BRCA2*) vyvíjejí často HER2 pozitivní karcinom a také karcinom podtypu luminal A, a také B.

**Obrázek 22** Rozložení imunohistochemických podtypů v souboru v závislosti na přítomnosti/absenci mutace



## 6.2 Analýza genů *CYP3A5* a *CYP1A2*

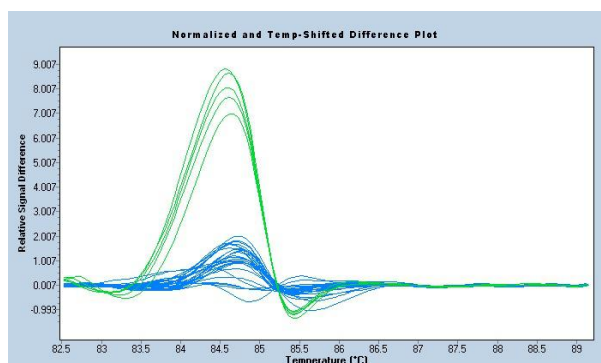
Geny *CYP3A5* a *CYP1A2* jsou geny zapojené v metabolismu estrogenu. High resolution melting analýza byla prováděna na souboru 1033 neselektovaných pacientů s karcinomem prsu a 662 kontrol.

V rámci předchozí studie s využitím NGS (platforma SOLiD), cílené na panel 581 genů, kde 141 genů bylo zapojených v opravách poškozené DNA a 449 dalších genů, souvisejících s výskytem prsních novotvarů, vybraných z databáze Phenopedia (Yu et al., 2009), bylo zachyceno v souboru 325 *BRCA1/BRCA2/PALB2* negativních pacientek s karcinomem prsu v 73 genech dalších 127 trunkačních variant způsobujících zkrácení proteinového produktu u téměř třetiny vyšetřovaných pacientek (Lhota et al., 2016). 36 unikátních trunkačních variant bylo nalezeno ve 25 genech kódujících proteiny zahrnuté v opravách poškozené DNA a 53 unikátních trunkačních variant v 48 genech nesouvisejících s opravami DNA, mezi kterými se jako jedny z nejvíce souvisejících genu s rozvojem karcinomu prsu jeví geny *CYP3A5* a *CYP1A2* (Lhota et al., 2016). Nejedná se ovšem o geny natolik klinicky relevantní, aby byly zařazeny do sekvenačního panelu CZE CANCA, proto na nich byla provedena samostatná mutační analýza

### 6.2.1 *CYP3A5* gen

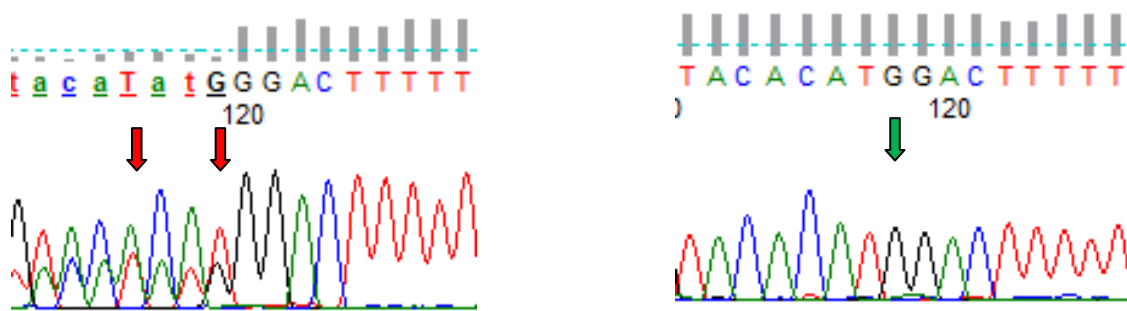
Výsledkem analýzy byl nález 31 aberantních profilů tání (profil tání přednostně sledované varianty je na Obr. 23, ostatní profily nalezených varianty jsou uvedeny v přílohách na konci textu), které dále byly confirmovány Sangerovým sekvenováním.

**Obrázek 23** Graf zobrazující relativní změnu signálu v závislosti na rostoucí teplotě pro variantu c.92dupG exon 2, gen *CYP3A5*. Modré křivky reprezentují wild type varianty, zelené varianty suspektní (pozitivní kontrola je také znázorněna zeleně).



Z těchto 31 profilů se varianta c.92dupG potvrdila celkem u 13 pacientů a 7 kontrol (Tab. 31). Tato varianta byla ve všech případech pacientů i kontrol ve vazbě s variantou c.88C>T. Dále byly nalezeny 3 intronové varianty nejasného významu a 8 variant exonových, taktéž nejasného klinického významu. Srovnání přesné sekvence nukleotidů u wild type varianty a mutantní varianty je znázorněno na Obr. 24. Tabulka všech nalezených variant je uvedena níže (Tab. 29).

**Obrázek 24** Sekvence genu *CYP3A5*, exon 2. Fragment vyšetřovaný na přítomnost mutace c92.dupG – zde je mutace zvýrazněna. Tato mutace je vždy doprovázena záměnou c.88c>t.



**Tabulka 29** Přehled alterací nalezených v exonu 2 genu *CYP3A5*

dle HGVS	protein HGVS	rs number	P (N=1033) mut N=(%)	K (N=662) mut N=(%)	p= (pro náš kontrolní soubor)	p= (pro kontrolní soubor EXAC)	EXAC mut (%)
c.92dupG	p.L22Tfs	rs200579169	13 (1,26%)	7 (1,06%)	0,82	0,049	(2,2%)
c.105A>G	p.R35G	.	0	1			
c.112A>G	p.I38V	.	0	1			
c.113T>C	p.I38T	.	0	1			
c.142G>A	p.G48R	.	0	1			
c.81G>A	p.G27G	.	0	1			
c.88C>T	p.Y31Y	rs28383468	13 (1,26%)	7 (1,06%)	0,82		(2,2%)
c.108G>A	p.L36L	.	0	1			
c.129G>A	p.P43P	.	0	1			
c.135T>C	p.P45P	.	0	1			
c.75-	.	.	0	1			
c.75-	.	.	0	1			
c.75-2a>g	.	.	0	1			

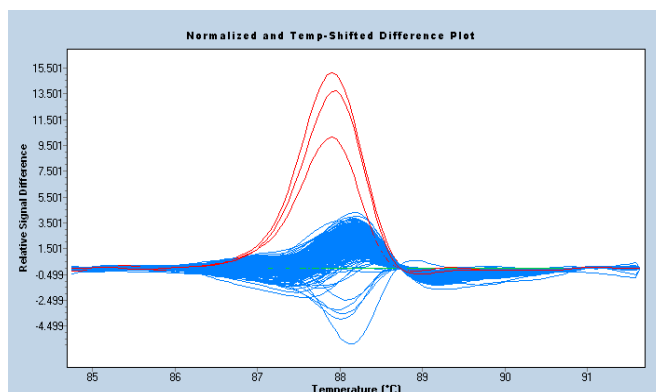
Pozn.: hlavní vyšetřovaná varianta je červeným písmem

## 6.2.2 *CYP1A2* gen

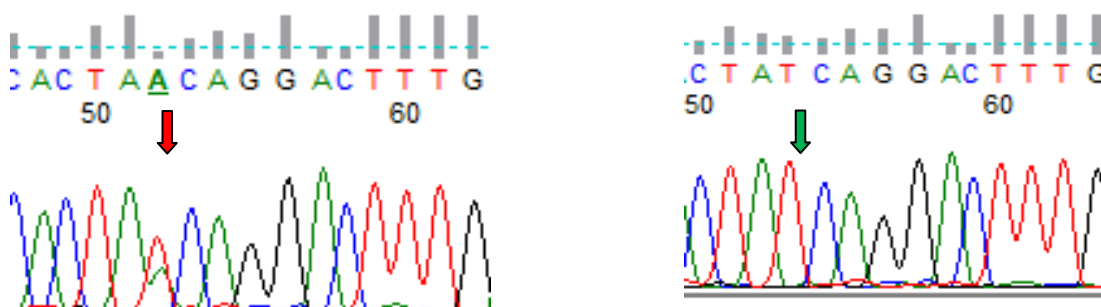
Stejný soubor pacientů i kontrol byl testován také na přítomnost záměnné mutace c.816T>A v exonu 2 genu *CYP1A2*. V tomto případě byla po confirmaci mutantní alela prokázána u 3 pacientů a žádné kontroly (Tab. 30). Další dvě dosud neidentifikované

intronové varianty byly nalezeny u 1 kontroly a 2 pacientů s neselektovaným C50. Získané výsledky jsou znázorněny na Obr. 25, sekvence poté na Obr 26.

**Obrázek 25** Graf zobrazující relativní změnu signálu v závislosti na rostoucí teplotě pro variantu c.816T>A exon 2, genu *CYP1A2*. Modré křivky reprezentují wild type varianty, červené spolu s pozitivní kontrolou varianty suspektní. Zeleně je podbarvena křivka negativní kontroly.



**Obrázek 26** Sekvence genu *CYP1A2*, exon 2. Fragment vyšetřovaný na přítomnost mutace c.816T>A .



Níže jsou v tabulce uvedeny všechny nalezené a potvrzené varianty genu *CYP1A2*, exonu 2.

Tabulka 30 Přehled alterací nalezených v exonu 2 genu <i>CYP1A2</i>							
dle HGVS	protein HGVS	rs Number	P(N=1033) mut N=(%)	K(N=66 2)mut N=(%)	p=(pro náš kontrolní soubor)	p= (pro kontrolní soubor EXAC)	EXAC mut (%)
c.816T>A	p.Y272*.	rs140421378	3 (0,29%)	0	0,29	0,02	(0,2 %)
c.831+6C>T	.	.	0	1			
c.831+21G>A	.	.	2	0			
Pozn.: hlavní vyšetřovaná varianta je červeným písmem							

## 7 Diskuze

Každoročně je onemocnění karcinomu prsu diagnostikováno více než 7000 ženám. Toto zhoubné nádorové onemocnění se tak v České republice řadí mezi nejčastější nádorová onemocnění, zatímco mortalitu se díky vysoké kvalitě zdravotnické péče daří držet na stejných hodnotách, incidence se neustále zvyšuje ([www.svod.cz](http://www.svod.cz)).

Většina nádorů je formy sporadické, ovšem ve zhruba v jedné desetině se jedná o nádory způsobené přítomností zárodečné mutace v různých penetrantních predispozičních genech, ve většině případů u vysoce penetrantních genů *BRCA1*, *BRCA2*.

V porovnání s genomovým či exomovým sekvenováním je panelové sekvenování spolehlivým, rychlým a přesným přístupem pro identifikaci nosičů patogenních variant v predispozičních genech, jehož nespornou výhodou je možnost výběru cílových genů a také menší nároky na bioinformatické zpracování. Je to také přístup vhodný pro vyšetření a případné identifikování dosud rutinně nevyšetřovaných kandidátních genů, které mohou také asociovat s karcinomem prsu u vysoce rizikových jedinců. Provedená analýza odhalila přítomnost alespoň jedné patogenní varianty u vysoce penetrantních genů (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*) u 35/263 (13,3 %) patientek s diagnózou C50, analyzovaných panelem CZEKANCA. U 4/263 (1,5 %) byly nalezeny dvě truncační varianty. U genů zvyšujících riziko vzniku karcinomu vaječníků (*BRIP1*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *RAD51C* a *RAD51D*) byly patogenní mutace nalezeny u 4/263 (1,5 %) pacientů. Analýza zbylých genů, jež jsou zařazeny v panelu CZEKANCA odhalila celkem 22/263 (8,4 %) nosičů potenciálně patogenních variant.

### 7.1 Varianty ve známých predispozičních genech („A“)

Nejvyšší frekvence výskytu patogenních variant byla ve vyšetřovaném souboru zjištěna u hlavních predispozičních genů *BRCA1* a *BRCA2* a to u 15 z 263 (5,7 %) neselektovaných patientek s karcinomem prsu. Výrazně vyšší byla dle předpokladů frekvence jejich mutací ve skupině žen splňujících indikační kritéria pro genetické testování (12 žen; 80 %),

nicméně i ve skupině pacientek, které indikační kritéria pro genetické testování nádorové predispozice nesplňovaly, byly patogenní mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* nalezeny u tří žen (20 %).

Mutace v těchto genech kódujících proteiny exprimované ve všech lidských buňkách, jež se podílejí na udržení integrity genetické informace, zejména pak na procesu tzv. homologní rekombinace DNA, jsou prokazatelně spojené se vznikem dědičného zhoubného nádorového onemocnění prsu (Petrucelli et al., 2010). Populační frekvence výskytu těchto mutací *BRCA1/2* se odhaduje na 1:800. Z námi získaných údajů vyplývá, že mutace v alespoň jednom z *BRCA* genů jsou zodpovědné na vznik skoro ¼ případů onemocnění karcinomem prsu s hereditární složkou. Převážná většina 10/15 (66,6 %) nosiček mutace v alespoň jednom z těchto genů byla mladší 50 let, z čehož 80 % žen bylo mladších 35 let. Až na jeden případ mucinózního karcinomu vyvinuly všechny ženy ductální typ karcinomu. Jedné pacientce byla diagnostikována patogenní mutace v genu *BRCA1* a zároveň v *BRCA2* a jedné v genu *BRCA1* a zároveň *CHEK2*. Vzhledem k absenci mutantních variant v souboru kontrol bohužel relativní riziko nemohlo být stanoveno ( $p < 0,001$ ).

Ostatní vysoce penetrantní, ovšem méně frekventní geny asociované s dědičným karcinomem prsu byly identifikovány u 20/263 (7,6 %) pacientek. Jednotlivé varianty byly nalezeny v genech *ATM*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*. Pro stanovení statistické významnosti byl použit Fisherův exaktní test, který jako další statisticky významný gen kromě genů *BRCA1* ( $p < 0,001$ ); *BRCA2* ( $p = 0,018$ ) vyhodnotil gen *CHEK2* ( $p = 0,013$ ). V tomto genu byla nalezena u 3/263 (1,1 %) pacientů varianta c.1100delC, klasifikována jako ztrátová mutace, jež vede k posunu čtecího rámce a tím k předčasné terminaci translace CHEK2 proteinu. Tato patogenní varianta je populačně specifická, v České republice se její frekvence v populaci pacientů s C50 pohybuje okolo 0,38 %. Velmi častou je pak například v Holandsku (3,58 %) (Kleibl et al., 2005). Ve dvou případech byla zaznamenána varianta c.846+4\_846+7delAGTA, vedoucí k výpadku exonu 6 a zkrácení proteinu o 18 aminokyselin (Desrichard et al., 2011). Dále byla v souboru identifikována jedna nosička evropské zakladatelské mutace c.444+1G>A, která je asociována se zvýšeným rizikem vzniku nejen karcinomu prsu, ale také prostaty, žaludku a štítné žlázy (Leedom et al., 2016). Zbylé dvě varianty c.349A>G a c.1180G>A jsou prozatím



klasifikovány jako varianty nejasného významu, některé studie je ovšem uvádějí jako poškozující ve spojení s hereditárním karcinomem prsu a ovárií (HBOC) (Southey, 2016).

Nalezené varianty v genu *ATM* byly prozatím spojeny se zvýšeným rizikem vzniku pro hereditární nádorové syndromy a také pro onemocnění ataxia telangiectasia. Pro gen *NBN* byla u 2/263 (0,8 %) identifikována záměna c.657\_661delACAAA, jež je asociována se vznikem HBOC a varianta c.93\_94delTG označená jako patogenní především pro mikrocefalus, ale také hereditární nádorový syndrom. Gen *PALB2*, lokalizační partner genu *BRCA2* je v současnosti spojován s HBOC a také karcinomem pankreatu. Jako patogenní byly popsány především posunové mutace. U 2/263 byla identifikována varianta c.172\_175delTTGT. Posunová varianta c.509\_510delGA byla identifikována taktéž u 2/263 pacientek. Nonsense varianta c.3256C>T je klasifikována rovněž jako poškozující. Především pro bělošskou populaci je riziko vzniku karcinomu prsu pro nosiče mutací v genu *PALB2* vyšší, a to 2-6x (Rahman et al., 2007).

Relativní riziko vzniku karcinomu prsu u výše uvedených vysoce penetrantních genů (mimo *BRCA1,2*) je odhadováno na 4,26 ( $p < 0,001$ ; CI 1,6 – 13,1).

## 7.2 Varianty v genech zvyšující riziko vzniku C56 („B“)

V této skupině byly nalezeny 3 poškozující varianty v celkem dvou genech (*RAD51C* a *MSH6*) u 4/263 (1,5 %) pacientů. V případě *RAD51C* byly nalezeny pouze nonsense záměny, 2x c.502A>T asociovaná s hereditárním nádorovým syndromem a c.664C>T. Ačkoliv byl *RAD51C* primárně spojován s karcinomem ovaria, recentní studie ukazují, že se jedná také o gen zvyšující riziko vzniku karcinomu prsu (Couch et al., 2015). V současné době se odhaduje, že mutace v tomto genu mohou indukovat onemocnění u zhruba 1 % pacientů se zvýšeným rizikem pro karcinom prsu a ovária (Lhota et al., 2016).

V *MSH6* byla identifikována u jedné pacientky poškozující c.3261dupC varianta podílející se na manifestaci Lynchova syndromu (Terui et al., 2013).

Přítomnost výše uvedených variant v ani jednom z genů nebyla v souboru zhodnocena jako statisticky významná (*RAD51C*  $p=0,09$ ; *MSH6*  $p=1$ ).

### 7.3 Potenciálně patogenní varianty nalezené v ostatních genech („C“)

Ve skupině potenciálně patogenních genů, u kterých prozatím jasně nebyla prokázána asociace s karcinomem prsu a ovária byly nalezeny suspektní varianty u 22/263 (8,4 %) pacientek ve 18 genech. Jako potenciálně patogenní byly ze souboru vybrány alterace měnící čtecí rámec a ty, jež vedly k předčasnému zařazení stop kodónu a které již nebyly vedeny jako benigní.

Ve skupině genů *ERCC*, což jsou geny kódující proteiny zprostředkovávající excizní reparaci DNA bylo nalezeno celkem 6 variant v 4 různých genech (*ERCC1*, *ERCC2*, *ERCC5*, *ERCC6*). Varianta v genu *ERCC2* c.1703\_1704delTT byla již v předchozí studii (Rump et al., 2016) reportována jako patogenní, kde byla potvrzena u 5/1345 (0,37 %) lidí s karcinomem prsu z Německa, Litvy a České republiky. 3/353 (0,84 %) nosičky přitom pocházely z ČR (Rump et al., 2016). V našem souboru byla alterace nalezena a potvrzena u 1/263 (0,38 %) pacientek. U genu *ERCC6* (také známý jako *CSB*) byly nalezeny tři varianty. Dle Ambry genetics prokazatelně patogenní záměna c.3862C>T a varianta c.2143G>T jsou asociovány se vznikem vzácného onemocnění charakterizovaného mikrocefálií, opožděným růstem a fotosenzitivitou, zvaným Cockayneův syndrom (Laugel et al., 2010; Calmels et al., 2016). Asociace s karcinomem prsu dosud nebyla nikde diskutována. Varianty c.2066\_2067delAA (*ERCC6*), c.875G>A (*ERCC1*) a c.2423C>T (*ERCC5*) zatím nebyly popsány.

Z celkem 16 genů asociovaných s onemocněním Fanconiho anemie (FA) (Rogers et al., 2014) skupiny *FANC* byly v našem souboru nalezeny potenciálně poškozující alterace v genech *FANCF*, *FANCL*, *FANCM* a *FANCG* u celkem 7/263 (2,6 %) pacientek. Fanconiho anemie je onemocnění spojené s chromozomální nestabilitou a náchylností k různým tumorům, mezi které patří také karcinom prsu (Yousoufian, 2001). Varianta v genu *FANCM* c.5791C>T se v našem souboru vyskytovala u 1/263 (0,4 %) pacientek a je dle (Kiiski et al., 2017) záměnou vyskytující se s vyšší frekvencí u pacientek s triple – negativním karcinomem prsu ve finské populaci (OR 1.94, 95% CI 0.87–4.32,  $p = 0.11$ ). V našem souboru pacientka vyvinula karcinom typu luminal B. Mutace c.1111\_1114 insATTA v genu *FANCL* nalezena u 3/263 (1,1 %) pacientek byla nejčastější nalezenou

variantou ve skupině *FANC* genů a je také variantou, u níž se na základě exomové studie předpokládá asociace s HBOC (Feliubadaló et al., 2017), nicméně v našem souboru byla tato varianta nalezena také u 2/317 kontrol. V genu *FANCG* záměna c.313G>T v našem souboru byla nalezena u 1/263 (0,38 %) pacientky, jež byla zároveň nosičkou patogenní mutace v genu *NBN*. Tato mutace v *FANCG* patří v evropské populaci mezi hlavní asociované s Fanconiho anemií (Gille et al., 2012). Žádný záznam v současné době není uveden pro posunovou variantu c.388dupC (*FANCF*) a c.3898G>T (*FANCM*).

Další skupinou genů, jejichž mutované formy mohou zvyšovat riziko vzniku karcinomu prsu, jsou geny *XRCC* skupiny, důležité pro opravu dvouvláknových zlomů DNA (Thacker and Zdzienicka, 2003). Konkrétně v genu *XRCC2* byla v jednom případě nalezena varianta c.96delT, která již byla v minulém roce testována jako potenciálně poškozující v souboru 3000 pacientek s karcinomem prsu a 2000 kontrol u polských žen s výsledkem frekvence 0,23 % u pacientek a 0,25 % u kontrol. V našem vyšetřovaném souboru byla nalezena s frekvencí 0,38 %. Tato varianta tedy pravděpodobně se sledovaným onemocněním nijak nesouvisí. K další nalezené alteraci c.2166dupT (*XRCC5*) dosud nejsou dostupné žádné informace.

U 1/263 pacientek nalezena protein zkracující varianta v genu *RNF168* c.391C>T je spojena se vznikem tzv. RIDDLE syndromu – vzácného onemocnění projevujícího se zvýšenou radiosenzitivitou, imunodeficiencí a krátkou postavou. Souvislost s karcinomem prsu s mutacemi v tomto genu nebyla zatím nikde popsána. U nosičky mutace v genu *RNF168* byla dále nalezena alterace c.3862C>T v genu *ERCC6*, jejíž možný klinický dopad je diskutován výše. Jako další gen, jehož mutantní varianty se mohou podílet na vzniku dědičného karcinomu prsu a u kterého byla v našem souboru nalezena varianta c.1859C>G zkracující finální protein u 2/263 (0,76 %) pacientek je gen kódující DNA helikázu spolupodílející se na DNA homologní rekombinaci *RECQL* (Banerjee and Brosh, 2015). Podobnou funkci jako *RECQL* vykonává gen *WRN* (známý také jako *RECQ2,3*). Ten kóduje tzv. Wernerův protein produkující helikázu a také funguje jako endonukleáza. Genetické změny v tomto proteinu způsobují vzácný syndrom předčasného stárnutí – Wernerův syndrom (Chen and Oshima, 2002) a jsou také asociovány s několika typy karcinomů, včetně karcinomu prsu. V našem souboru jedenkrát nalezené alterace

c.4215C>T a také c.1105C>T byly ve studii (Yokote et al., 2017) reportovány jako patogenní.

S možným zvýšeným rizikem karcinomu prsu jsou dále spojeny alterace v genech *ZNF365*, *XPA*, *RAD50*, *MSH3*. Všechny tyto geny kódují proteiny zajišťující různé typy oprav DNA. Frekvence námi nalezených záměn v těchto genech byla vždy 0,38 % a identifikované varianty prozatím nebyly nikde popsány. Varianta identifikovaná v genu *CASP8*, zapojeném v aktivaci apoptózy, c. c.1402\_1403delTG byla nalezena také u jedné pacientky, která je zároveň nosičkou vysoce penetrantní mutace v genu *BRCA1*.

## 7.4 Varianty nalezené v genech *CYP3A5* a *CYP1A2*

Poškození enzymů zajišťujících metabolismus estrogenů může vést ke hromadění estrogenů v tkáni a tím podpořit vznik karcinomu prsu (Lhota et al., 2016). Na základě studie Lhota et al. 2016, kde bylo testováno 581 genů u 325 *BRCA1/BRCA2/PALB2* negativních patientek s karcinomem prsu se jevily jako nejvíce potenciálně poškozující geny *CYP3A5* a *CYP1A2* zapojené v odbourávání estrogenů, resp. jejich varianty c.92dupG a c.816T>A, (obě v exonech 2) které ovšem nejsou zahrnuty v panelu CZECA-NCA a proto na nich byla provedena samostatná mutační analýza metodou HRM.

Varianta c.92dupG byla nalezena u 13/1033 (12,6 %) pacientů s neselektovaným karcinomem prsu a u 7/662 (10,5 %) nenádorových kontrol. V každém jednom případě byla varianta c.92dupG ve vazbě se záměnou c.88C>T. Frekvence výskytu varianty v evropské non-Finnish populaci při zahájení práce ještě nebyla zveřejněna, ovšem v mezidobí byly údaje doplněny do databáze EXAC a frekvence byla stanovena na cca 2,2 %. Statistickou významnost nalezené varianty z dat získaných z našeho souboru a souboru kontrolní databáze EXAC pro non-Finnish populaci jsme ověřili pomocí Fisherova exaktního testu. S p - hodnotou 0,048 a poměrem šancí 0,57 (95 % CI 0,301-0,98) byla varianta zhodnocena jako statisticky významná a oproti očekávání, její význam byl vyhodnocen jako protektivní. Pro definitivní potvrzení charakteru této záměny bude potřeba analýz na rozsáhlejších souborech.

Záměna c.816T>A byla identifikována u 3/1033 (0,3 %) pacientů a žádné kontroly. Frekvence výskytu v běžné populaci (non – Finnish) je asi 0,02 %. Srovnáním

s frekvencemi výskytu v EXAC kontrolní non – Finnish populaci byla opět Fisherovým exaktním testem tato alterace vyhodnocena jako statisticky významná (OR 5,9; 95% CI 1,11-21,00;  $p = 0,02$ ). *CYP1A2* je tedy dobrým kandidátním genem, jehož mutace mohou souviset se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu. Stejně jako u genu *CYP3A5*, tuto hypotézu bude potřeba ověřit na rozsáhlejších souborech pacientů, případně je ověřit segregačními analýzami, pokud budou dostupné informace o dalších členech rodiny.

## 8 Závěr

V diplomové práci byly identifikovány u 61/263 (23,2 %) pacientů poškozující a potenciálně poškozující alterace v 26/219 genů. Podle předpokladu, nejvíce frekventní varianty byly nalezeny v hlavních predispozičních, vysoce penetrantních genech *BRCA1*, *BRCA2*. Také ve středně penetrantních genech asociovaných se zvýšeným rizikem karcinomu prsu *CHEK2* a *PALB2* byl nalezen poměrně velký počet variant. Dle očekávání většina poškozujících alterací byla identifikována u patientek indikovaných ke genetickému testování. Naproti tomu analýza odhalila také celkem velkou skupinu patientek, které současná indikační kritéria nesplňují, a tudíž by v současné době nebyly geneticky vyšetřeny a nebyly by zařazeny do preventivních programů, ačkoliv u nich je genetická složka onemocnění také přítomna.

Analýza dále ukázala vcelku velký počet variant v genech, u nichž asociace s karcinomem prsu není prozatím zcela zřejmá. Ačkoliv je gen *RAD51C* primárně spojen se zvýšeným rizikem karcinomu vaječníků, v poslední době je také stále více diskutována jeho asociace s karcinomem prsu. Ve většině případů byly identifikovány potenciálně patogenní alterace v genech zapojených v reparaci DNA, které i přes svou nízkou frekvenci mohou souviset s vývojem onemocnění. Některé záměny nebyly ovšem dosud popsány. Pro definitivní potvrzení role nalezených variant v etologii karcinomu prsu bude potřeba další analýzy. Mezi vhodné kandidátní geny pro následné analýzy byly vybrány geny skupiny *ERCC* (*ERCC1*, *ERCC2*, *ERCC6*), geny skupiny *FANC* (*FANCF*, *FANCG*, *FANCL*) a geny *CASP8*, *RAD50*, *RNF168*, *RECQL*, *WRN*, *XPA*, *XRCC5*, *ZNF365*.

Mutační analýzou HRM exonu 2 genů *CYP3A5* a *CYP1A2* na rozšířeném souboru 1033 pacientů a jejich porovnáním s kontrolní databází EXAC bylo zjištěno, že varianta c.92dupG v genu *CYP3A5* s největší pravděpodobností riziko karcinomu prsu nijak nezvyšuje a naopak má význam spíše protektivní. Varianta c.816T>A v genu *CYP1A2* byla vyhodnocena jako poškozující. Tyto hypotézy bude ovšem nezbytné ověřit na širším souboru pacientů, případně (v případě dostupnosti klinických údajů dalších členů rodiny) provést segregací analýzy.

## 9 Seznam zkratek

*ATM* – ATM serine/threonine kinase gene  
*ATRIP* – ATR interacting protein gene  
BDT – Big dye terminator  
*BRCA1,2* – Breast cancer 1,2 gene  
*BRIP* – BRCA1 interacting protein C- terminal helicase  
CAD – Carbaomyl – phosphate synthetase 2  
*CASP8* – Caspase 8 gene  
CCD –Charge coupled device  
*ccnd1* – Cyclin D1 gene  
*CDH1* – Cadherin 1 gene  
CI – Confidence interval  
COMT – Catechol-O-methyltransferase  
*CYP1A1, 1A2, 1B1,3A5, 19A1* – Cytochrome P450 family genes  
CZECANCA – Czech cancer panel for clinical application  
DCIS – Ductal carcinoma in situ  
DNA – Deoxyribonucleic acid  
DNA-PK – Deoxyribonucleic acid protein kinase  
*DYPD* – Dihydropyrimidine dehydrogenase gene  
EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid  
*EPCAM* - Epithelial cell adhesion molecule gene  
ER+/- - Estrogen receptor +/-  
*erb2* – Erb-b2 receptor tyrosine kinase gene  
*ERCC1,2,3,5,6* - ERCC excision repair 1,2,3,5,6 genes  
EtOH - Ethanol  
*FANCF* – Fanconi anemia complementation group F gene  
*FANCG* - Fanconi anemia complementation group G gene  
*FANCL* - Fanconi anemia complementation group L gene  
*FANCM* - Fanconi anemia complementation group M gene  
HBOC – Hereditary breast ovarian cancer  
*HELQ* – Helicase gene

HGVS – Human genome variation society  
 HRM – High resolution melting  
*CHEK2*, Chk2 – Checkpoint kinase 2  
 IDC – Invasive ductal carcinoma  
 IGV – Integrative genomics viewer  
 ILC – Invasive lobular carcinoma  
 LCIS – Lobular carcinoma in situ  
 LOVD – Leiden open variation database  
 MAF – Minor allele frequency  
*MLH1* – MutL homolog 1 gene  
*MRE11* – Double strand break repair nuclease gene  
 MRI – Magnetic resonance imaging  
*MSH2*, 3, 5, 6 – MutS homolog 2, 3, 5, 6 gene  
*myc* – *myc* proto oncogene  
 NADPH - Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
 NaOAc - Sodium acetate  
*NBN*(=*NBS1*) – Nibrin gene  
 NCCN – National comprehensive cancer network  
*NF1* – Neurofibromin 1 gene  
 NGS - New generation sequencing  
 NHEJ – Nonhomologous end joining  
 OR – Odds ratio  
*PALB2* (= *FANCD1*) – Partner and localizer of *BRCA2* gene  
 PCR – Polymerase chain reaction  
 PEG - polyethyleneglykol  
 PR – Progesterone receptor  
*PRKDC* – Protein kinase, DNA – activated catalytic polypeptide gene  
*PTEN* – Phosphatase and tensin homolog gene  
*RAD51*, 50, 51C, 51D, 52, 54 – Double strand break repair protein 51, 50, 51C, 51D, 52, 54 gene  
*rb1* – retinoblastoma 1 gene  
*RECQL* – RecQ like helicase gene  
 RIDDLE - Radiosensitivity, immunodeficiency dysmorphic features and learning difficulties



RNA – Ribonucleic acid

*RNF168* – Ring finger protein 168 gene

RR – Relative risk

SBS – Sequencing by synthesis

SNP – Single nucleotide polymorphism

SNV – Single nucleotide variant

SOLiD - Sequencing by oligonucleotide ligation and detection

ssDNA – Single strand deoxyribonucleic acid

*STK11* – Serine/threonine kinase 11 gene

*TELO2* – Telomere maintenance 2 gene

TNBC – Triple negative breast cancer

*TP53*,p53 – Tumor protein p53

*WRN* – Werner syndrome RecQ like helicase gene

*XPA* – Xeroderma pigmentosum, complementation group A gene

*XRCC1,2,3,4,5* – X – ray repair cross complementing 1,2,3,4,5 gene

*ZNF365* – Zinc finger protein 365 gene

## 10 Seznam použité literatury

- van Aswegen CH, Purdy RH, Wittliff JL. 1989. Binding of 2-hydroxyestradiol and 4-hydroxyestradiol to estrogen receptors from human breast cancers. *J Steroid Biochem* 32:485–492.
- Banerjee T, Brosh RMJ. 2015. RECQL: a new breast cancer susceptibility gene. *Cell Cycle* 14:3540–3543.
- Bartkova J, Tommiska J, Oplustilova L, Aaltonen K, Tamminen A, Heikkinen T, Mistrik M, Aittomäki K, Blomqvist C, Heikkilä P, Lukas J, Nevanlinna H, Bartek J. 2008. Aberrations of the MRE11-RAD50-NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene. *Mol Oncol* 2:296–316.
- Bell DW, Brannigan BW, Matsuo K, Finkelstein DM, Sordella R, Settleman J, Mitsudomi T, Haber DA. 2008. Increased prevalence of EGFR-mutant lung cancer in women and in East Asian populations: Analysis of estrogen-related polymorphisms. *Clin Cancer Res* 14:4079–4084.
- Calmels N, Greff G, Obringer C, Kempf N, Gasnier C, Tarabeux J, Miguet M, Baujat G, Bessis D, Bretones P, Cavau A, Digeon B, Doco-Fenzy M, Doray B, Feillet F, Gardeazabal J, Gener B, Julia S, Llano-Rivas I, Mazur A, Michot C, Renaldo-Robin F, Rossi M, Sabouraud P, Keren B, Depienne C, Muller J, Mandel JL, Laugel V. 2016. Uncommon nucleotide excision repair phenotypes revealed by targeted high-throughput sequencing. *Orphanet J Rare Dis* 11.
- Carr BR, Macdonald PC, Simpson ER. 1983. The role of lipoproteins in the regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum. *Obstet Gynecol Surv* [Internet] 38:216–217. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)46511-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(16)46511-8).
- Claus EB, Risch N, Thompson WD. 1993. The calculation of breast cancer risk for women with a first degree family history of ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]

- 28:115–120. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8173064>.
- Claus EB, Risch N, Thompson WD. 1994. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer* [Internet] 73:643–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8299086>.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 2001. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* (London, England) [Internet] 358:1389–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11705483>.
- Corso G, Intra M, Trentin C, Veronesi P, Galimberti V. 2016. CDH1 germline mutations and hereditary lobular breast cancer. *Fam Cancer* 15:215–219.
- Couch FJ, Hart SN, Sharma P, Toland AE, Wang X, Miron P, Olson JE, Godwin AK, Pankratz VS, Olswold C, Slettedahl S, Hallberg E, Guidugli L, Davila J, Beckmann MW, Janni W, Rack B, Ekici AB, Slamon DJ, Konstantopoulou I, Fostira F, Vratimos A, Fountzilas G, Peltari LM, Tapper WJ, Durcan L, Cross SS, Pilarski R, Shapiro CL, Klemp J, Yao S, Garber J, Cox A, Brauch H, Ambrosone C, Nevanlinna H, Yannoukakos D, Slager SL, Vachon CM, Eccles DM, Fasching PA. 2015. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol* 33:304–311.
- Cribb AE, Knight MJ, Dryer D, Guernsey J, Hender K, Tesch M, Saleh TM. 2006. Role of polymorphic human cytochrome P450 enzymes in estrone oxidation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:551–558.
- Cybulski C, Wokołorczyk D, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, Górski B, Dębniak T, Masojć B, Jakubowska A, Gliniewicz B, Sikorski A, Stawicka M, Godlewski D, Kwias Z, Antczak A, Kraika K, Lauer W, Sosnowski M, Sikorska-Radek P, Bar K, Klijer R, Zdrojowy R, Małkiewicz B, Borkowski A, Borkowski T, Szwiec M, Narod SA, Lubiński J. 2006. A large germline deletion in the Chek2 kinase gene is associated with an increased risk of prostate cancer. *J Med Genet* 43:863–866.

- Desrichard A, Bidet Y, Uhrhammer N, Bignon YJ. 2011. CHEK2 contribution to hereditary breast cancer in non-BRCA families. *Breast Cancer Res* 13:1–11.
- Featherstone C, Jackson SP. 1998. DNA repair: the Nijmegen breakage syndrome protein. *CurrBiol* 8:R622–R625.
- Feliubadaló L, Tonda R, Gausachs M, Trotta JR, Castellanos E, López-Doriga A, Teulé À, Tornero E, Del Valle J, Gel B, Gut M, Pineda M, González S, Menéndez M, Navarro M, Capellá G, Gut I, Serra E, Brunet J, Beltran S, Lázaro C. 2017. Benchmarking of whole exome sequencing and Ad Hoc designed panels for genetic testing of hereditary cancer. *Sci Rep* 7.
- For R, Of C, With P, Cancer O, Individuals H, Germline W. 2003. BARTOŠKOVÁ H., FORETOVÁ L., HELMICOVÁ E., KALÁBOVÁ R., KLEIBL Z., KONOPÁSEK B., KRUTÍLKOVÁ V., MACHÁČKOVÁ E., NOVOTNÝ J., PETRÁKOVÁ K., PETRUŠELKA L., PLEVOVÁ P., POHLREICH P., ROB L., SKOVAJSOVÁ M., VESELÝ J., ŠALOUDEK J. Souhrn: :28–34.
- Foretová L, Macháčková E, Palácová M, Navrátilová M, Svoboda M, Petráková K. 2016. Doporučení rozšíření indikačních kritérií ke genetickému testování mutací v genech BRCA1 a BRCA2 u hereditárního syndromu nádorů prsu a ovarií. *Klin Onkol* 29:S9–S13.
- Foulkes WD. 2008. Inherited Susceptibility to Common Cancers. *N Engl J Med* [Internet] 359:2143–2153. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0802968>.
- Gille JJP, Floor K, Kerkhoven L, Ameziane N, Joenje H, de Winter JP. 2012. Diagnosis of Fanconi Anemia: Mutation Analysis by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and PCR-Based Sanger Sequencing. *Anemia* [Internet] 2012:603253. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3388349&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the first two decades. *Cell* 143:59–73.

- The next generation. Vol. 144, Cell. 2011. p. 646–74. Ilmarks of cancer: The next generation. Cell 144.
- Hayashi S-I, Eguchi H, Tanimoto K, Yoshida T, Omoto Y, Inoue a, Yoshida N, Yamaguchi Y. 2003. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocr Relat Cancer* 10:193–202.
- Howell SJ, Hockenhull K, Salih Z, Evans DG. 2017. Increased risk of breast cancer in neurofibromatosis type 1: Current insights. *Breast Cancer Targets Ther* 9:531–536.
- Huang Z, Fasco MJ, Figge HL, Keyomarsi K, Kaminsky LS. 1996. Expression of cytochromes P450 in human breast tissue and tumors. *Drug Metab Dispos [Internet]* 24:899–905. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8869826>.
- Huang Z, Miao S, Wang L, Zhang P, Wu B, Wu J, Huang Y. 2015. Clinical characteristics and STK11 gene mutations in Chinese children with Peutz-Jeghers syndrome. *BMC Gastroenterol* 15.
- Chen L, Oshima J. 2002. Werner syndrome. *J Biomed Biotechnol* 2:46–54.
- Janatová M, Borecká M, Soukupová J, Kleiblová P, Stříbrná J, Vočka M, Zemánková P, Panczak A, Veselá K, Souček P, Foretová L, Kleibl Z. 2016. PALB2 as another candidate gene for genetic testing in patients with hereditary breast cancer in Czech Republic. *Klin Onkol* 29.
- Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RHM. 2004. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. In: *Maturitas*. Vol. 49. . p 34–43.
- Khanna KK, Jackson SP. 2001. DNA double-strand breaks: signalling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27:247–254.
- Kiiski JI, Tervasmäki A, Pelttari LM, Khan S, Mantere T, Pylkäs K, Mannermaa A, Tengström M, Kvist A, Borg Å, Kosma V-M, Kallioniemi A, Schleutker J, Bützow R, Blomqvist C, Aittomäki K, Winqvist R, Nevanlinna H. 2017. FANCM mutation c.5791C>T is a risk factor for triple-negative breast cancer in the Finnish population. *Breast Cancer Res Treat* 166.

- Kleibl Z, Kristensen VN. 2016. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. *The Breast* [Internet] 28:136–144. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960977616300650>.
- Kleibl Z, Novotny J, Bezďickova D, Malik R, Kleiblova P, Foretova L, Petruzelka L, Ilencikova D, Cinek P, Pohlreich P. 2005. The CHEK2 c.1100delC germline mutation rarely contributes to breast cancer development in the Czech Republic. *Breast Cancer Res Treat* 90:165–167.
- Krejčí A, Müller P, Vojtěšek B. 2015. Bioinformatika a sekvenování nové generace. *Klin Onkol* 28:2S91-2S96.
- Kuschel B, Auranen A, McBride S, Novik KL, Antoniou A, Lipscombe JM, Day NE, Easton DF, Ponder B a J, Pharoah PDP, Dunning A. 2002. Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet* [Internet] 11:1399–407. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023982>.
- Lane DP, Crawford L V. 1979. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells [19]. *Nature* 278:261–263.
- Larsen MJ, Thomassen M, Gerdes A, Kruse TA. 2014. Hereditary Breast Cancer: Clinical, Pathological and Molecular Characteristics. *Breast Cancer Basic Clin Res* 8:145–155.
- Laugel V, Dalloz C, Durand M, Sauvanaud F, Kristensen U, Vincent MC, Pasquier L, Odent S, Cormier-Daire V, Gener B, Tobias ES, Tolmie JL, Martin-Coignard D, Drouin-Garraud V, Heron D, Journal H, Raffo E, Vigneron J, Lyonnet S, Murday V, Gubser-Mercati D, Funalot B, Brueton L, Sanchez Del Pozo J, Muñoz E, Gennery AR, Salih M, Noruzinia M, Prescott K, Ramos L, Stark Z, Fieggen K, Chabrol B, Sarda P, Edery P, Bloch-Zupan A, Fawcett H, Pham D, Egly JM, Lehmann AR, Sarasin A, Dollfus H. 2010. Mutation update for the CSB/ERCC6 and CSA/ERCC8 genes involved in Cockayne syndrome. *Hum Mutat* 31:113–126.
- Leedom TP, LaDuca H, McFarland R, Li S, Dolinsky JS, Chao EC. 2016. Breast cancer risk is similar for CHEK2 founder and non-founder mutation carriers. *Cancer Genet* [Internet] 209:403–407. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cancergen.2016.08.005>.

Lhota F, Zemankova P, Kleiblova P, Soukupova J, Vocka M, Stranecky V, Janatova M, Hartmannova H, Hodanova K, Kmoch S, Kleibl Z. 2016. Hereditary truncating mutations of DNA repair and other genes in BRCA1/BRCA2/PALB2-negatively tested breast cancer patients. *Clin Genet* 90:324–333.

Liu Y, West SC. 2002. Distinct functions of BRCA1 and BRCA2 in double-strand break repair. *Breast Cancer Res* [Internet] 4:9–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11879553>5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC138716>.

Macháčková E, Plevová P, Lukešová M, Vašíčková P, Šilhánová E, Foretová L. 2006. Genetická predispozice ke vzniku maligního nádoru prsu. *Klin Onkol* 19:48–54.

Malkin D. 2011. Li-fraumeni syndrome. *Genes Cancer* 2:475–84.

Mansfield CM. 1993. A review of the etiology of breast cancer. *J Natl Med Assoc* [Internet] 85:217–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2571884&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-eidens D, Futreal PA, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Tran T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-strano A, Katcher H, Yakumo K, Shaffer D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bogden R, Harshman K, Gholami Z, Dayananth P, Ward J, Tonin P, Narod S, Bristow PK, Norris FH, Helvering L, Morrison P, Rosteck P, Lai M, Barrett JC, Lewis C, Neuhausen S, Cannon-albright L, Goldgar D, Wiseman R, Kamb A, Skolnick MH. 1994. Candidate Ovarian and Breast Susceptibility Gene for the Cancer. *Science* (80- ) 266:5–11.

Miller WL, Strauss JF. 1999. Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69:131–141.

- Minion LE, Dolinsky JS, Chase DM, Dunlop CL, Chao EC, Monk BJ. 2015. Hereditary predisposition to ovarian cancer, looking beyond BRCA1/BRCA2. *Gynecol Oncol* [Internet] 137:86–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.01.537>.
- NCCN. 2016. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Breast Cancer. Version 1.2016 [Internet]:1–191. Available from: [www.nccn.org/patients](http://www.nccn.org/patients).
- Nevanlinna H, Bartek J. 2006. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Oncogene* 25:5912–5919.
- O’Brate A, Giannakakou P. 2003. The importance of p53 location: Nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resist Updat* 6:313–322.
- Parl FF, Egan KM, Li C, Crooke PS. 2009. Estrogen exposure, metabolism, and enzyme variants in a model for breast cancer risk prediction. *Cancer Inform* 7:109–121.
- Peltomäki P. 2005. Lynch syndrome genes. *Fam Cancer* 4:227–232.
- Petráková K, Palácová M, Schneiderová M, Standara M. 2016. [Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome]. *Klin Onkol* [Internet] 29 Suppl 1:S14-21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26691938>.
- Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL. 2010. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genet Med* 12:245–259.
- Phipps RF, Perry PM. 1988. Familial breast cancer. *Postgrad Med J* 64:847–849.
- Pilarski R. 2009. Cowden syndrome: A critical review of the clinical literature. *J Genet Couns* 18:13–27.
- Pohlreich P, Kleibl Z, Kleiblová P, Janatová M, Soukupová J, Macháčková E, Házová J, Vašíčková P, Sťahlová Hrabincová E, Navrátilová M, Svoboda M, Foretová L. 2012. [The clinical importance of a genetic analysis of moderate-risk cancer susceptibility genes in breast and other cancer patients from the Czech Republic]. *Klin Onkol Cas Ces a Slov Onkol Spol* [Internet] 25 Suppl:S59-66. Available from:



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22920209>.

- Raftogianis R, Creveling C, Weinshilboum R, Weisz J. 2000. Estrogen metabolism by conjugation. *J Natl Cancer Inst Monogr*:113–124.
- Rahman N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A, Reid S, Spanova K, Barfoot R, Chagtai T, Jayatilake H, McGuffog L, Hanks S, Evans DG, Eccles D, Easton DF, Stratton MR. 2007. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 39:165–167.
- Rogers KJ, Fu W, Akey JM, Monnat RJ. 2014. Global and disease-associated genetic variation in the human Fanconi anemia gene family. *Hum Mol Genet* 23:6815–6825.
- Rump A, Benet-Pages A, Schubert S, Kuhlmann JD, Janavičius R, Macháčková E, Foretová L, Kleibl Z, Lhota F, Zemankova P, Betscheva-Krajcir E, Mackenroth L, Hackmann K, Lehmann J, Nissen A, DiDonato N, Opitz R, Thiele H, Kast K, Wimberger P, Holinski-Feder E, Emmert S, Schröck E, Klink B. 2016. Identification and Functional Testing of ERCC2 Mutations in a Multi-national Cohort of Patients with Familial Breast- and Ovarian Cancer. *PLoS Genet* 12.
- Russo J, Moral R, Balogh GA, Mailo D, Russo IH. 2005. The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 7:131–142.
- Samavat H, Kurzer MS. 2015. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett* 356:231–243.
- Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK. 2010. Various types and management of breast cancer: an overview. *J Adv Pharm Technol Res [Internet]* 1:109–26. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3255438&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Schneider J, Huh MM, Bradlow HL, Fishman J. 1984. Antiestrogen Action of 2-Hydroxyestrone on MCF-7 Human Breast Cancer Cells\*. *J Biol Chem* 259:4840–4845.

- Schroeder C, Faust U, Sturm M, Hackmann K, Grundmann K, Harmuth F, Bosse K, Kehrer M, Benkert T, Klink B, Mackenroth L, Betscheva-Krajcir E, Wimberger P, Kast K, Heilig M, Nguyen HP, Riess O, Schröck E, Bauer P, Rump A. 2015. HBOC multi-gene panel testing: comparison of two sequencing centers. *Breast Cancer Res Treat* 152:129–136.
- Soukupová J, Zemánková P, Kleiblová P, Janatová M, Kleibl Z. 2016a. CZE CANCA: CZEch CANcer paNel for Clinical Application-- Design and Optimization of the Targeted Sequencing Panel for the Identification of Cancer Susceptibility in High-risk Individuals from the Czech Republic. *Klin Onkol [Internet]* 29 Suppl 1:S46-54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26691942>.
- Soukupová J, Zemánková P, Kleiblová P, Janatová M, Kleibl Z. 2016b. PŮVODNÍ PRÁCE CZE CANCA : CZEch CANcer paNel for Clinical Application – návrh a příprava cíleného sekvenčního panelu pro identifikaci nádorové predispozice u rizikových osob v České republice CZE CANCA : CZEch CANcer paNel for Clinical Application – Desig. 29.
- Southey MC et. al. 2016. PALB2, CHEK2 and ATM rare variants and cancer risk: data from COGS. *J Med Genet* 53:800–811.
- Tai YC, Domchek S, Parmigiani G, Chen S. 2007. Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 99:1811–1814.
- Telang NT, Katdare M, Bradlow HL, Osborne MP. 1997. Estradiol metabolism: An endocrine biomarker for modulation of human mammary carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 105:559–564.
- Terui H, Tachikawa T, Kakuta M, Nishimura Y, Yatsuoka T, Yamaguchi K, Yura K, Akagi K. 2013. Molecular and clinical characteristics of MSH6 germline variants detected in colorectal cancer patients. *Oncol Rep* 30:2909–2916.
- Thacker J, Zdzienicka MZ. 2003. The mammalian XRCC genes: Their roles in DNA repair and genetic stability. *DNA Repair (Amst)* 2:655–672.

- Tischkowitz M, Xia B. 2010. PALB2/FANCN: Recombining cancer and fanconi anemia. *Cancer Res* 70:7353–7359.
- Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. 1972. Menopause and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* [Internet] 48:605–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5058966>.
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T. 2005. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett* 227:115–124.
- Varley JM. 2003. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* 21:313–320.
- Wahl GM, Linke SP, Paulson TG, Huang LC. 1997. Maintaining genetic stability through TP53 mediated checkpoint control. *Cancer Surv* [Internet] 29:183–219. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9338102>.
- Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, Roeb W, Agnew KJ, Stray SM, Wickramanayake A, Norquist B, Pennington KP, Garcia RL, King M-C, Swisher EM. 2011. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci* [Internet] 108:18032–18037. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1115052108>.
- Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. 2001. Human DNA repair genes. *Science* (80- ) 291:1284–1289.
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. 1995. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* [Internet] 378:789–92. Available from: <http://www.nature.com/nature/journal/v378/n6559/abs/378789a0.html%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8524414>.
- Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, Liu X, Jasin M, Couch FJ,

- Livingston DM. 2006. Control of BRCA2 Cellular and Clinical Functions by a Nuclear Partner, PALB2. *Mol Cell* 22:719–729.
- Yokote K, Chanprasert S, Lee L, Eirich K, Takemoto M, Watanabe A, Koizumi N, Lessel D, Mori T, Hisama FM, Ladd PD, Angle B, Baris H, Cefle K, Palanduz S, Ozturk S, Chateau A, Deguchi K, Easwar TKM, Federico A, Fox A, Grebe TA, Hay B, Nampoothiri S, Seiter K, Streeten E, Piñón-Aguilar RE, Poke G, Poot M, Posmyk R, Martin GM, Kubisch C, Schindler D, Oshima J. 2017. WRN Mutation Update: Mutation Spectrum, Patient Registries, and Translational Prospects. *Hum Mutat* 38:7–15.
- Yoshida K, Miki Y. 2004. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci* 95:866–871.
- Youssefian H. 2001. Fanconi anemia and breast cancer: What's the connection? *Nat Genet* 27:352–353.
- Yu W, Clyne M, Khoury MJ, Gwinn M. 2009. Phenopedia and genopedia: Disease-centered and gene-centered views of the evolving knowledge of human genetic associations. *Bioinformatics* 26:145–146.
- Zannini L, Delia D, Buscemi G. 2014. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J Mol Cell Biol* 6:442–457.
- Zhang F, Ma J, Wu J, Ye L, Cai H, Xia B, Yu X. 2009. PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response. *Curr Biol* 19:524–529.
- Zhu BT, Liehr JG. 1993. Inhibition of the Catechol-O-Methyltransferase-Catalyzed O-Methylation of 2- and 4-Hydroxyestradiol by Catecholamines: Implications for the Mechanism of Estrogen-Induced Carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 304:248–256.
- Zimovjanová M. 2009. Hereditární karcinom prsu Příklad vzácnější formy karcinomu prsu v populaci. *Onkologie* 3:348–350.

**Knižní a elektronické zdroje:**

Krška Zdeněk, Hoskovec David *Chirurgická onkologie*. První vydání. Praha: Grada Publishing a.s., 2014. 904s. ISBN 978-80-247-4284-7.

Dušek Ladislav, Mužík Jan, Kubásek Miroslav, Koptíková Jana, Žaloudík Jan, Vyzula Rostislav. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2018-4-06]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802-8861.

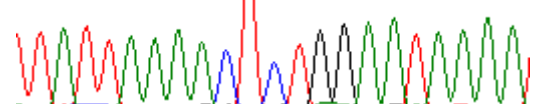
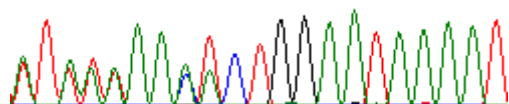
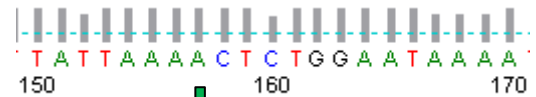
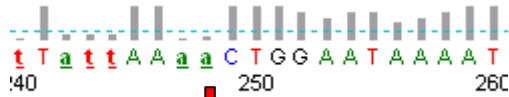
Májek, O., Daneš, J., Skovajsová, M., Bartoňková, H., Šnajdrová, L., Gregor, J., Mužík, J., Dušek, L. Mamo.cz – Program mamografického screeningu v České republice [online]. Masarykova univerzita, Brno, 2018. [cit. 2018-04-06]. Dostupný z WWW: <http://www.mamo.cz>. ISSN 1804-0861.

# 11 Přílohy

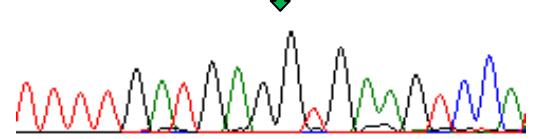
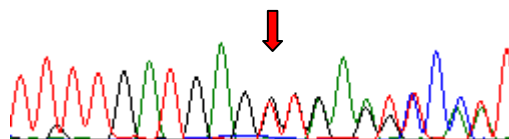
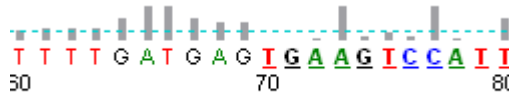
**Příloha 1 a)** Sekvence confirmovaných patogenních variant „A“ skupiny genů.

Mutantní sekvence je uvedena vlevo, k ní wild type vpravo.

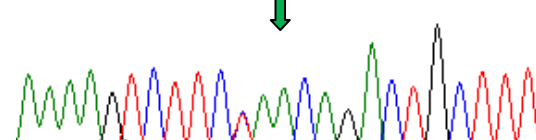
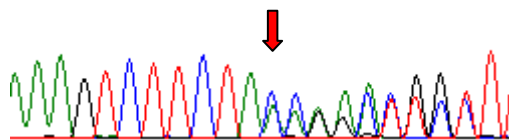
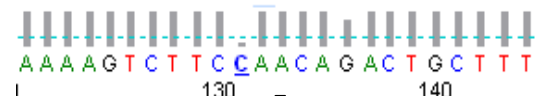
*ATM*:NM\_000051:exon10:c.1447\_1448delCT:p.L483fs



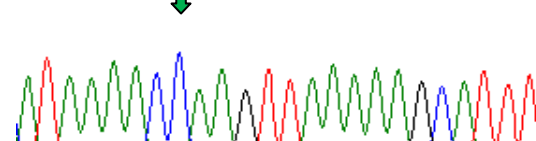
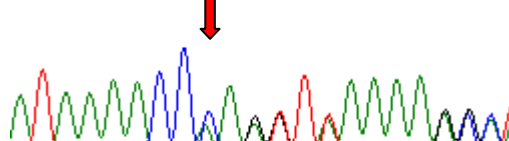
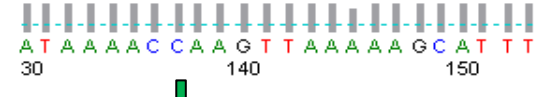
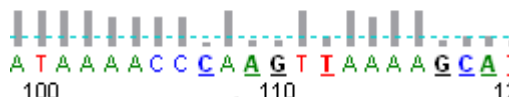
*ATM*:NM\_000051:exon26:c.3801delG:p.V1268fs



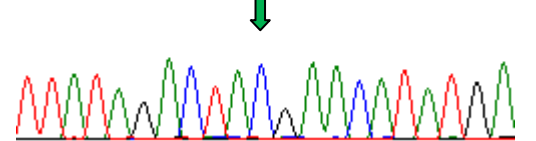
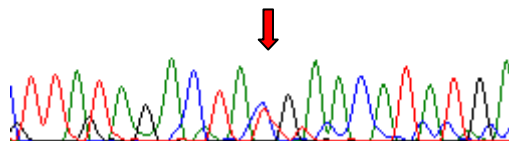
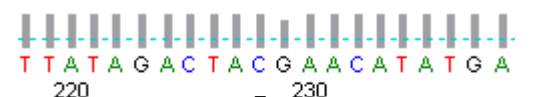
*ATM*:NM\_000051:exon26:c.3849delA:p.L1283fs



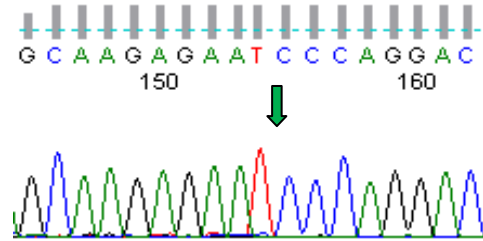
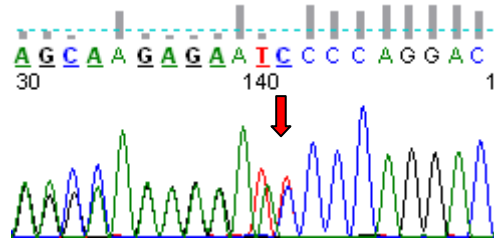
*ATM*:NM\_000051:exon28:c.4196dupC:p.T1399fs



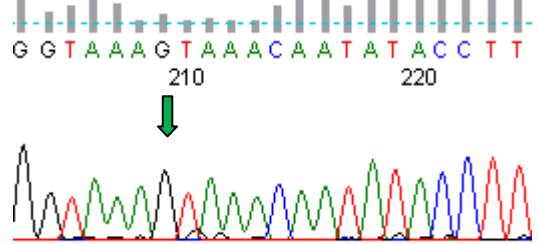
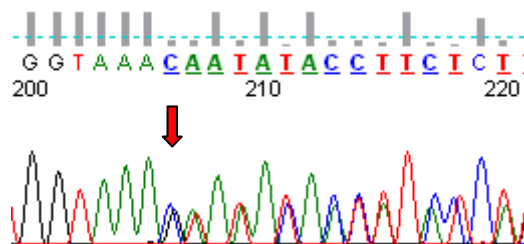
*ATM*:NM\_000051:exon42:c.6100C>T:p.R2034\*



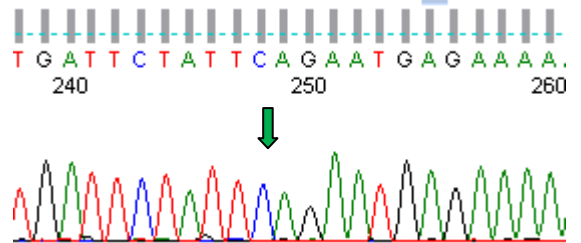
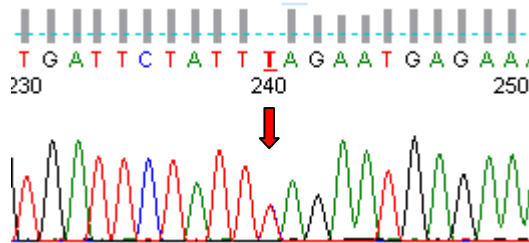
*BRCA1*:NM\_007294:exon19:c.5266dupC:p.Q1756fs



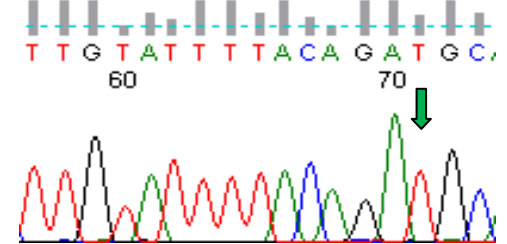
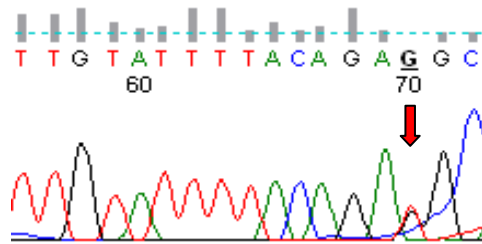
*BRCA1*:NM\_007294:exon10:c.3700\_3704delGTAA: p.V1234Qfs



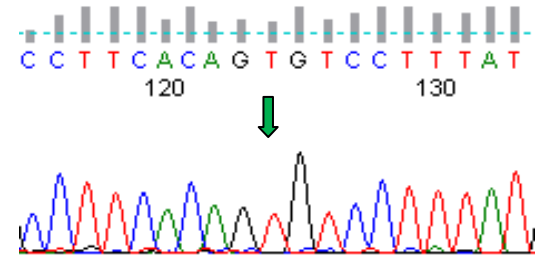
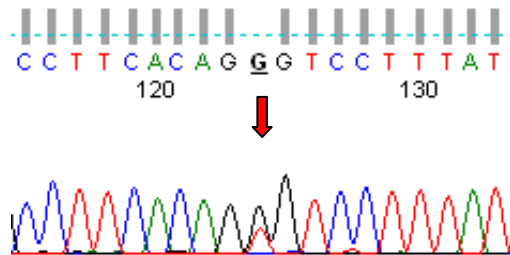
*BRCA1*:NM\_007294:exon10:c.1687C>T:p.Q563\*



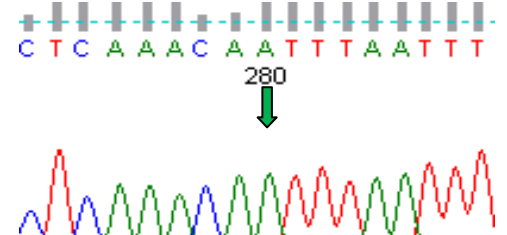
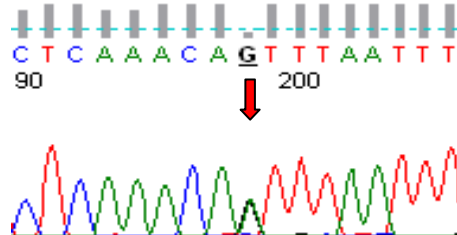
*BRCA1*:NM\_007294:exon6:c.303T>G:p.Y101\*



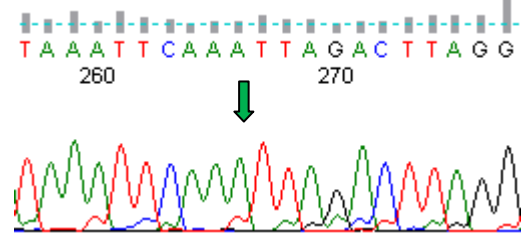
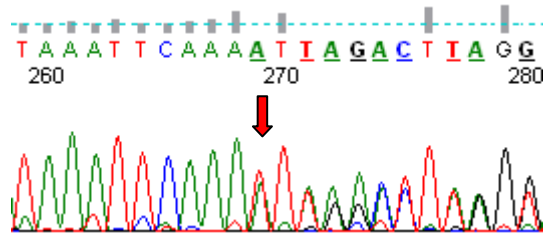
*BRCA1*:NM\_007294:exon4:c.181T>G:p.C61G



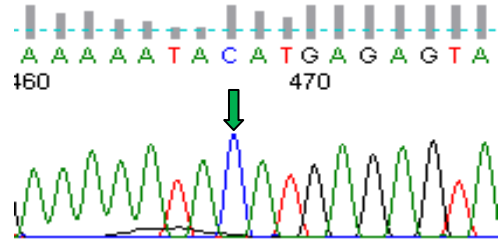
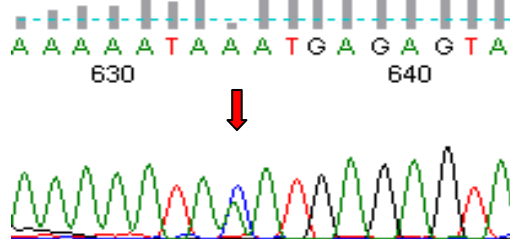
*BRCA1*:NM\_007294:exon6:c.213-12A>G



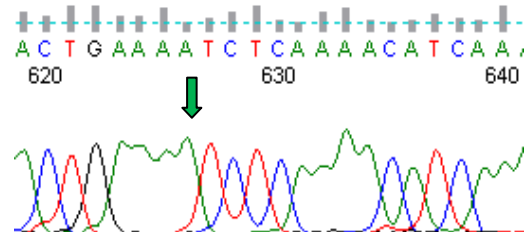
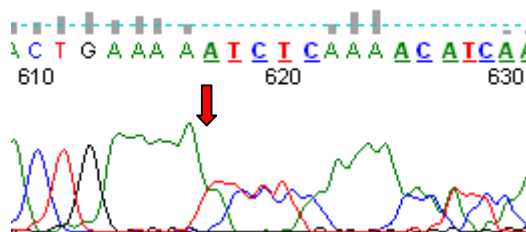
BRCA2:NM\_000059:exon3:c.304dupA:p.F101fs



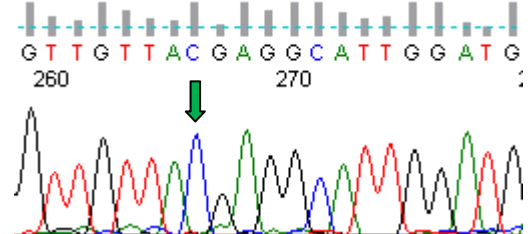
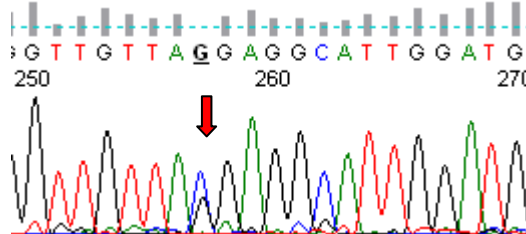
BRCA2:NM\_000059:exon11:c.2517C>A:p.Y839\*



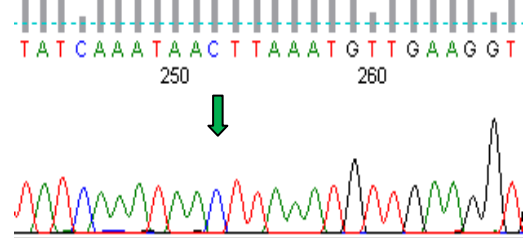
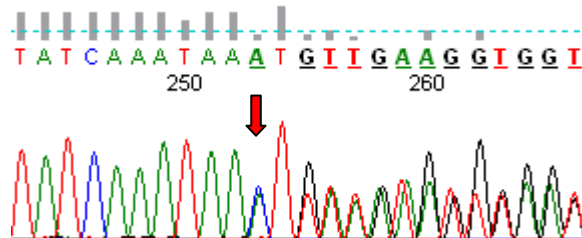
BRCA2:NM\_000059:exon11:c.4874dupA:p.E1625fs



BRCA2:NM\_000059:exon11:c.5682C>G:p.Y1894\*

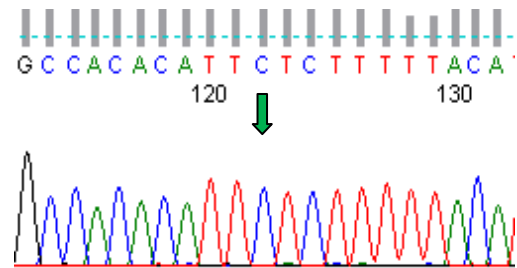
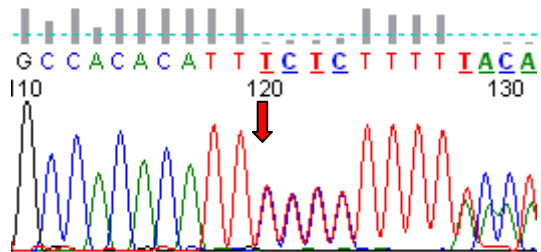


BRCA2:NM\_000059:exon11:c.6402\_6406delCTTAA:p.N2135fs

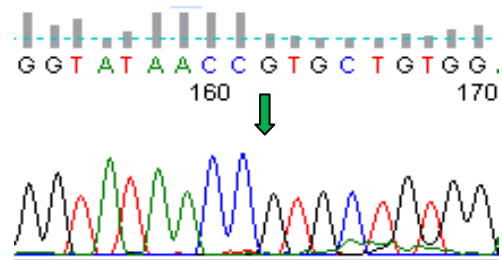
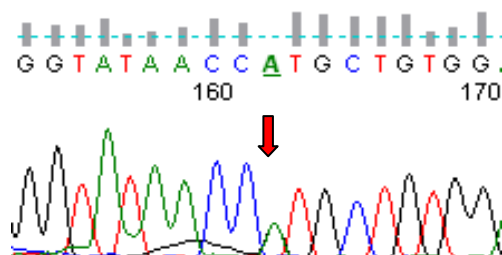




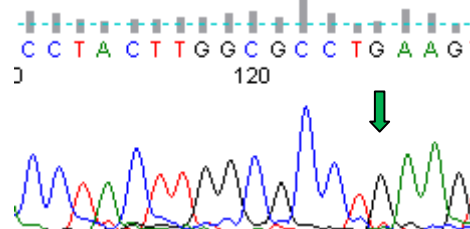
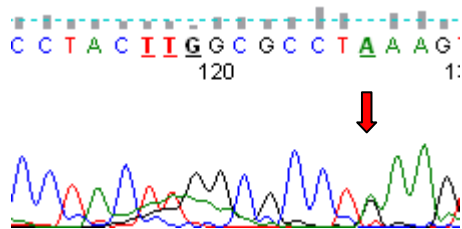
BRCA2:NM\_000059:exon11:c.6753dupT:p.H2251fs



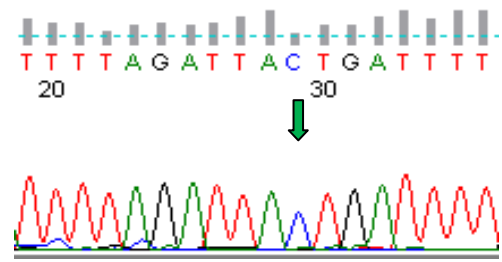
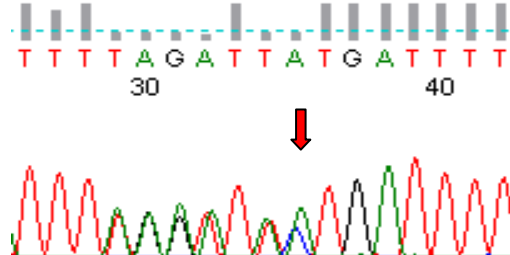
CHEK2:NM\_007194:exon11:c.1217G>A:p.R406H



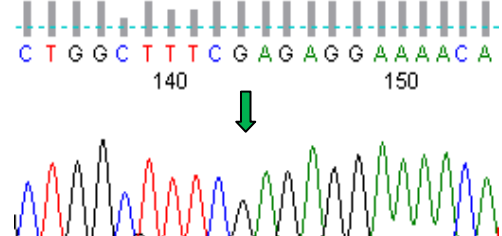
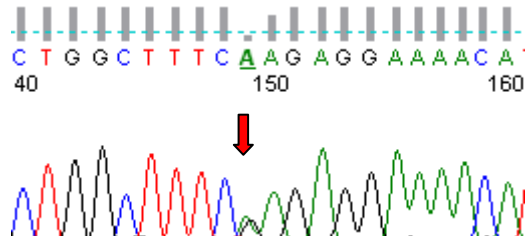
CHEK2:NM\_007194:exon11:c.1180G>A:p.E394K



CHEK2:NM\_007194:exon11:c.1100delC:p.T367fs

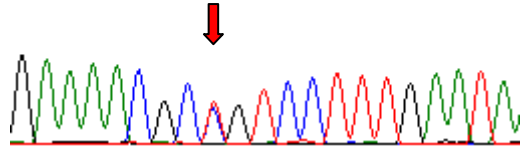


CHEK2:NM\_007194:exon6:c.715G>A:p.E239K



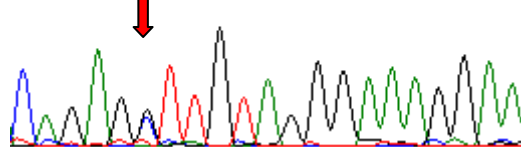
CHEK2:NM\_007194:exon4:c.541C>T;p.R181C

G A A A C G C I G T C C T T T G A A T A .  
110 320 330



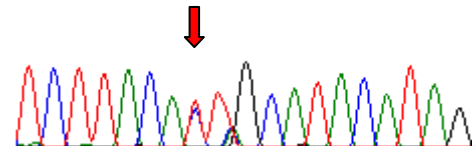
CHEK2:NM\_007194:exon4:c.520C>G;p.L174V

C A G A G G T T G T A G G G A A A G G A A .  
220 230 240



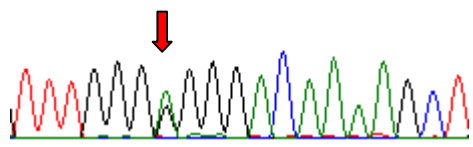
CHEK2:NM\_007194:exon4:c.470T>C;p.I157T

T C T T A C A C T G C A T A C A T A G .  
80 90



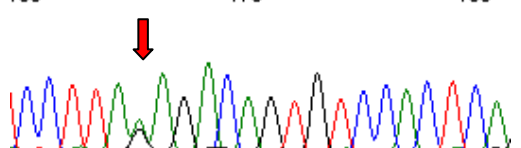
CHEK2:NM\_007194:exon3:c.349A>G;p.R117G

T T T G G G G G G A C A A A A G C T .  
50 60



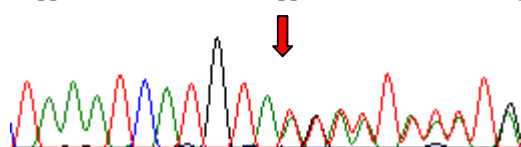
CHEK2:NM\_007194:exon2:c.190G>A;p.E64K

C C T T A A G A C A G T G T C C A C T C A .  
160 170 180

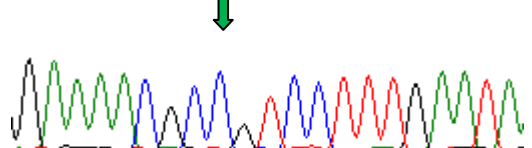


CHEK2: NM\_007194:exon ?? :c.846+4\_846+7delAGTA; p. 265-283del18

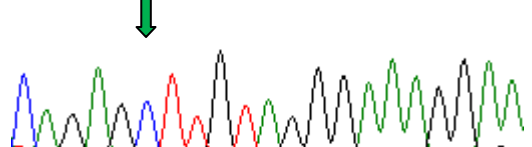
T A A A T C A T G T A I I A I A I A I G .  
80 90 1



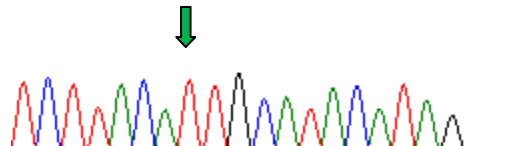
G A A A C G C C G T C C T T T G A A T A .  
300 310



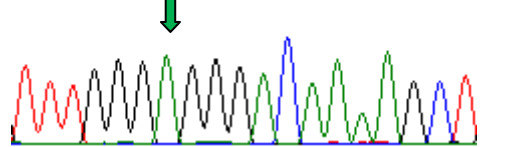
C A G A G C T T G T A G G G A A A G G A A .  
280 290



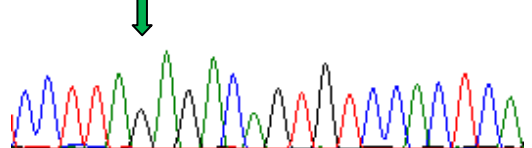
T C T T A C A T T G C A T A C A T A G .  
230 240



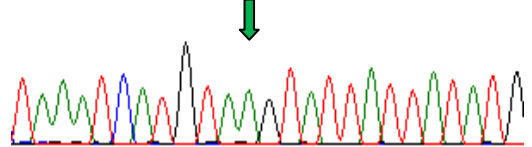
T T T G G G A G G G A C A A A A G C T .  
60



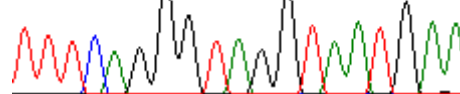
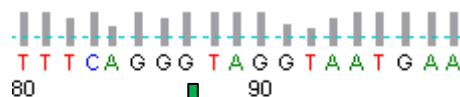
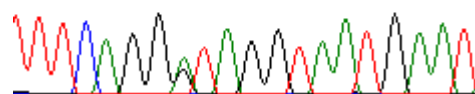
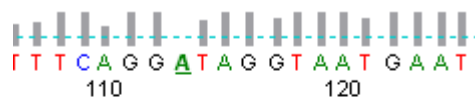
C C T T A G A G A C A G T G T C C A C T C A .  
160 170 180



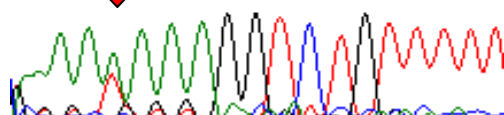
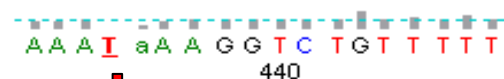
T A A A T C A T G T A A G T A T T A T T A T G .  
90 100 110



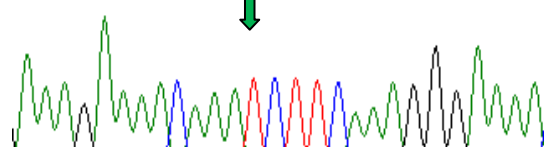
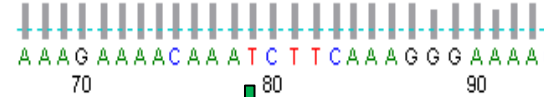
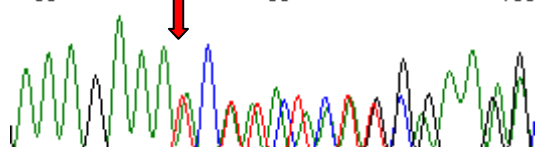
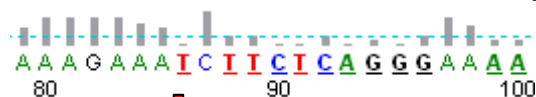
*CHEK2*: NM\_007194:exon4:c.444+1G>A



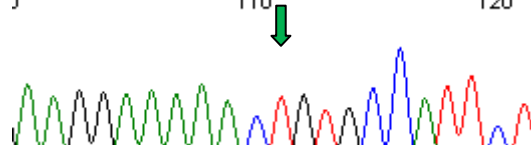
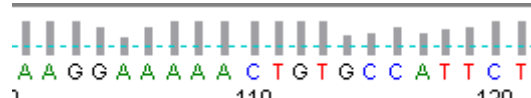
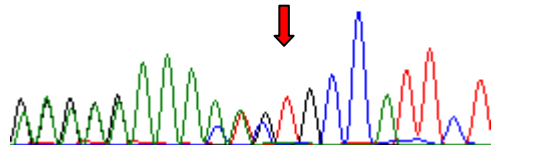
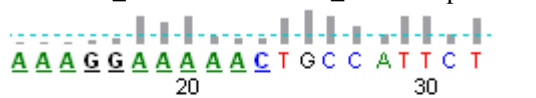
*NBN*:NM\_002485:exon10:c.1393A>T:p.K465\* - Není dostupná odpovídající wt sekvenec



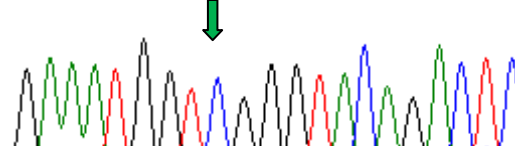
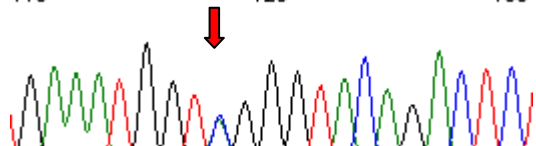
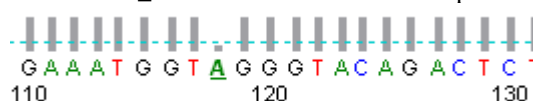
*NBN*:NM\_002485:exon6:c.657\_661delACAAA:p.K219fs



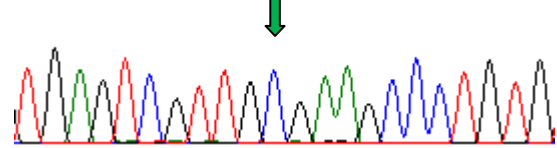
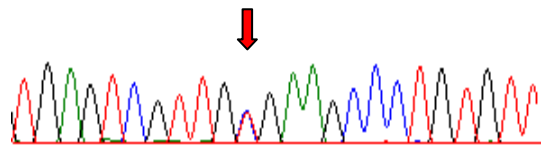
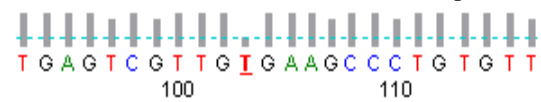
*NBN*:NM\_002485:exon2:c.93\_94delTG:p..A32fs



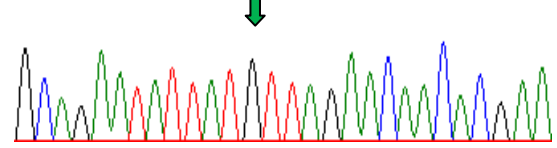
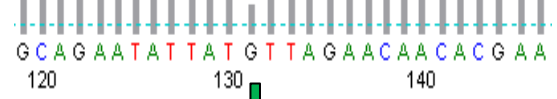
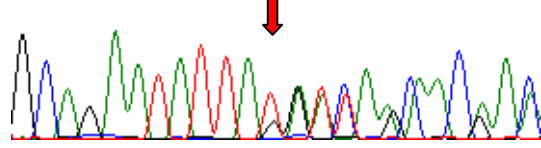
*PALB2*:NM\_024675:exon13:c.3494C>A:p.S1165\*



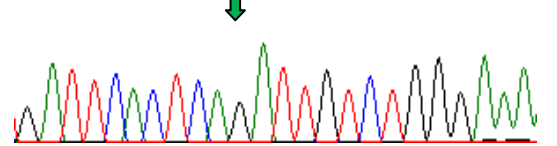
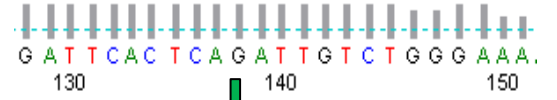
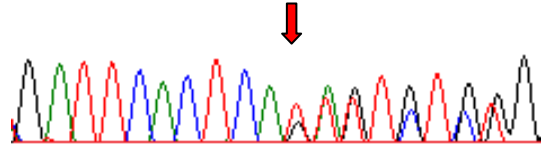
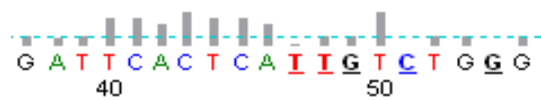
*PALB2*:NM\_024675:exon12:c.3256C>T;p.R1086\*



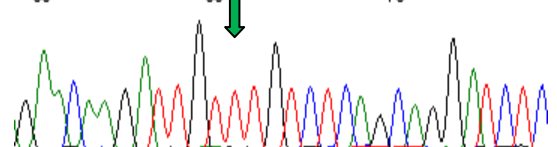
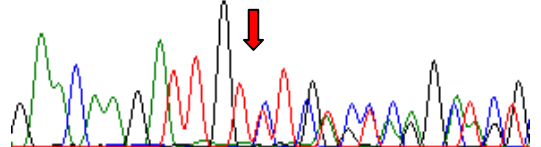
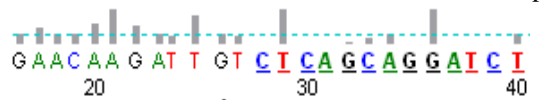
*PALB2*:NM\_024675:exon4:c.1227\_1231delTGTTA;p.Y409fs



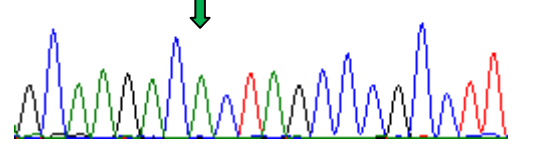
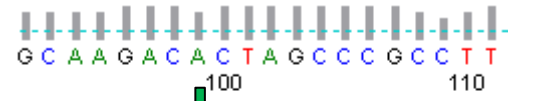
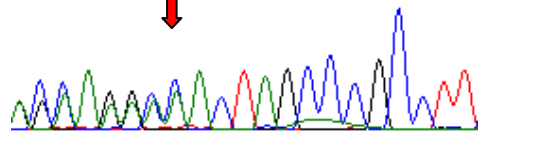
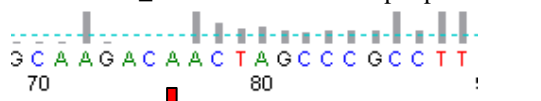
*PALB2*:NM\_024675:exon4:c.509\_510delGA :p.R170fs



*PALB2*:NM\_024675:exon3:c.172\_175delTTGT;p.Q60fs

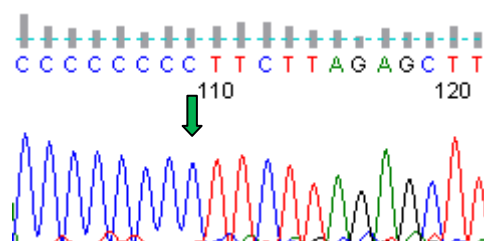
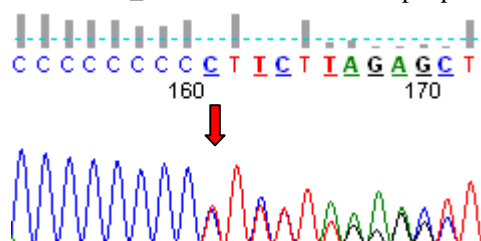


*PALB2*:NM\_024675:exon2:c.93dupA;p.L32fs

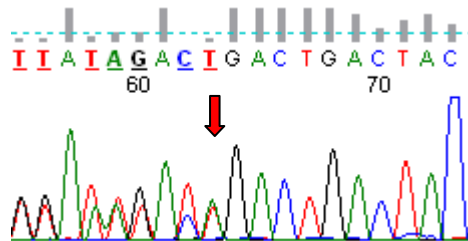


**b)** Sekvence confirmovaných patogenních variant „B“ skupiny genů. Mutantní sekvence je uvedena vlevo, k ní wild type vpravo.

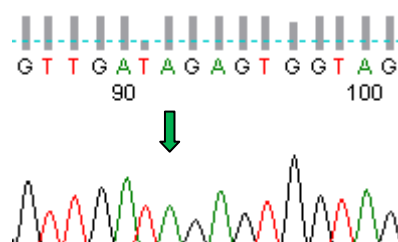
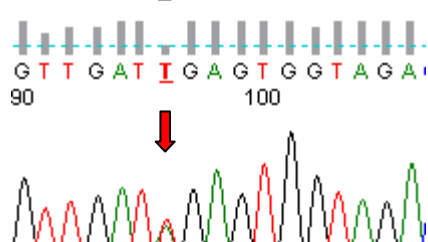
*MSH6*:NM\_000179:exon5:c.3254dupC:p.T1085fs



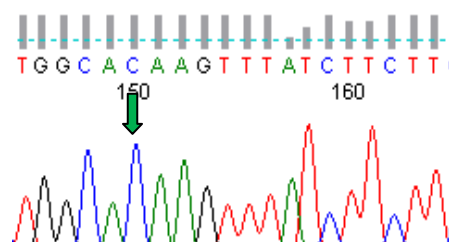
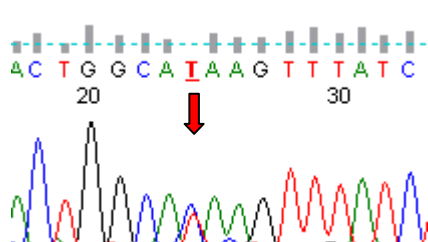
*MSH6*:NM\_000179:exon10:c.4082\_4083insGACT:p.X1361delins\* Není dostupná wt sekvence



*RAD51C*:NM\_058216:exon3:c.502A>T:p.R168\*



*RAD51C*:NM\_058216:exon4:c.664C>T:p.Q222\*



**Příloha 2 a)** Tabulky s výsledky Fisherova exaktního testu. Statisticky významné hodnoty jsou zvýrazněny tučně.

Gen	Pac (N=263)		Ctrl (N=317)		p - hodnota	poměr šancí	CI 95
	<b>non-carriers</b>	<b>263</b>	<b>non-carriers</b>	<b>317</b>			
<i>ATM</i>	260	3	315	2	0,6629602	1,815413	0.2063533 21.8836923
<i>BRCA1</i>	253	10	317	0	<b>0,000334148</b>	-	<b>2.770293</b> -
<i>BRCA2</i>	257	5	317	0	<b>0,01857642</b>	-	<b>1.117686</b> -
<i>CHEK2</i>	254	8	316	1	<b>0,01320962</b>	<b>9,921504</b>	<b>1.315772 442.077391</b>
<i>NBN</i>	259	3	316	1	0,3331701	3,652579	0.2912988 192.5521482
<i>PALB2</i>	257	6	315	2	0,1497515	3,669322	0.6491005 37.4968968
<b>„A“ celkem</b>	<b>228</b>	<b>35</b>	<b>311</b>	<b>6</b>	<b>5,30E-08</b>	<b>7,930441</b>	<b>3.228346 23.462714</b>
<i>ATM</i>	260	3	315	2	0,6629602	1,815413	0.2063533 21.8836923
<i>CHEK2</i>	254	8	316	1	0,01320962	9,921504	1.315772 442.077391
<i>NBN</i>	259	3	316	1	0,3331701	3,652579	0.2912988 192.5521482
<i>PALB2</i>	257	6	315	2	0,1497515	3,669322	0.6491005 37.4968968
<b>„A“ ost celk</b>	<b>243</b>	<b>20</b>	<b>311</b>	<b>6</b>	<b>0,001042361</b>	<b>4,25613</b>	<b>1.616695 13.155920</b>
<i>BRCA1</i>	253	10	317	0	0,000334148	-	2.770293 -
<i>BRCA2</i>	257	5	317	0	0,01857642	-	1.117686 -
<b>„A“ BRCA</b>	<b>248</b>	<b>15</b>	<b>317</b>	<b>0</b>	<b>5,63E-06</b>	<b>-</b>	<b>4.516913</b> -
<i>MSH6</i>	262	1	315	2	1	0,6016519	0.01015684 11.61758497
<i>RAD51C</i>	260	3	317	0	0,09265378	-	0.4994438 -
<b>„B“ celkem</b>	<b>259</b>	<b>4</b>	<b>315</b>	<b>2</b>	<b>0,4179468</b>	<b>2,428794</b>	<b>0.344986 27.055882</b>
<i>CASP8</i>	262	1	317	0	0,4534483	-	0.03090543 -
<i>ERCC1</i>	262	1	317	0	0,4534483	-	0.03090543 -
<i>ERCC2</i>	262	1	316	1	1	1,205711	0.01531454 94.90359327
<i>ERCC5</i>	262	1	317	0	0,4534483	-	0.03090543 -
<i>ERCC6</i>	260	3	317	0	0,09265378	-	0.4994438 -
<i>FANCF</i>	262	1	317	0	0,4534483	-	0.03090543 -
<i>FANCG</i>	262	1	317	0	0,4534483	-	0.03090543 -
<i>FANCL</i>	260	3	315	2	0,6629602	1,815413	0.2063533 21.8836923
<i>MSH3</i>	262	1	317	0	0,4534483	-	0.03090543 -
<i>FANCM</i>	261	2	317	0	0,2051873	-	0.2265689 -
<i>RAD50</i>	262	1	316	1	1	1,205711	0.01531454 94.90359327
<i>RECQL</i>	261	2	316	1	0,5928176	2,417856	0.1252161 143.1824302
<i>RNF168</i>	262	1	317	0	0,4534483	-	0.03090543 -
<i>WRN</i>	261	2	317	0	0,2051873	-	0.2265689 -
<i>XPA</i>	262	1	317	0	0,4534483	-	0.03090543 -
<i>XRCC1</i>	263	0	316	1	1	0	0.00000 46.97384
<i>XRCC2</i>	262	1	317	0	0,4534483	-	0.03090543 -
<i>XRCC5</i>	262	1	317	0	0,4534483	-	0.03090543 -
<i>ZNF365</i>	262	1	317	0	0,4534483	-	0.03090543 -
<b>„C“ celkem</b>	<b>238</b>	<b>25</b>	<b>311</b>	<b>6</b>	<b>0,000149662</b>	<b>4,408291</b>	<b>1.904792 11.437644</b>

Gen	Pac (N=1033)		Ctrl (N=662)		p - hodnota	poměr šancí	CI 95
	non-carriers	1033	non-carriers	662			
<i>CYP3A5</i>	1020	13	655	7	0,8198972	1,192422	0.4394463 3.5491421
<i>CYP1A2</i>	1030	3	662	0	0,2855095	-	0.2648639 -

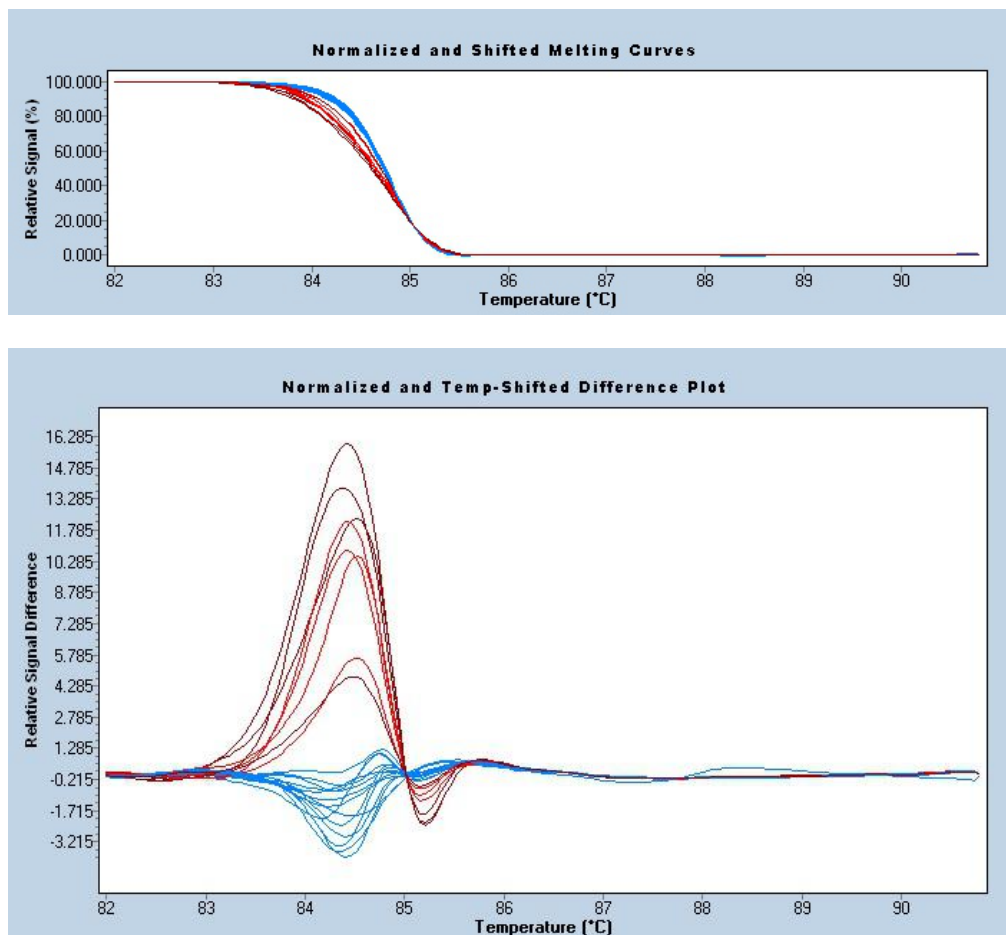
b) Tabulky s výsledky Fisherova exaktního testu pro geny *CYP3A5* a *CYP1A2* při použití kontrolního souboru databáze EXAC. Statisticky významné hodnoty jsou zvýrazněny tučně.

Gen	Pac (N=1033)		Ctrl (N=33344)		p - hodnota	poměr šancí	CI 95
	non-carriers	1033	non-carriers	33344			
<i>CYP3A5</i>	1020	13	32616	728	0,048962	0,571009	0.4394463 3.5491421

Gen	Pac (N=1033)		Ctrl (N=32979)		p - hodnota	poměr šancí	CI 95
	non-carriers	1033	non-carriers	32979			
<i>CYP1A2</i>	1030	3	32616	16	0,018825	5,999766	1.118541 21.006001

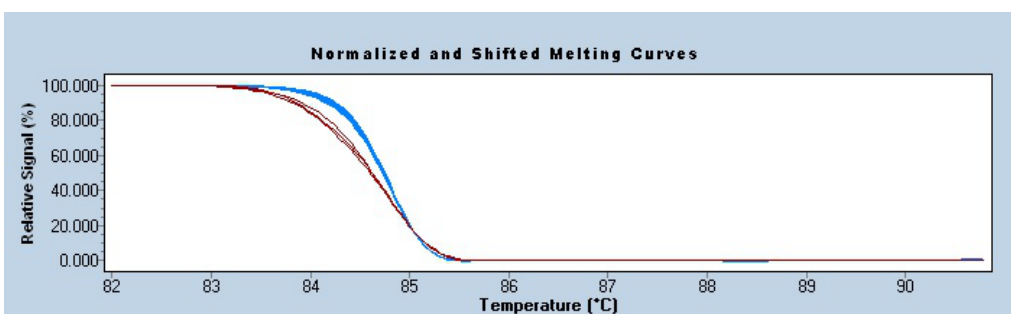
#### Příloha 4 a1) Všechny další nalezené exonové varianty v genu *CYP3A5*, exon 2

Graf zobrazující relativní změnu signálu v závislosti na rostoucí teplotě pro varianty c.81G>A, c.105A>G, c.108G>A, c.112A>G, c.113T>C, c.129G>A, c.135T>C, c.142G>A genu *CYP3A5*, Modré křivky reprezentují wild type varianty, červené spolu varianty suspektní.

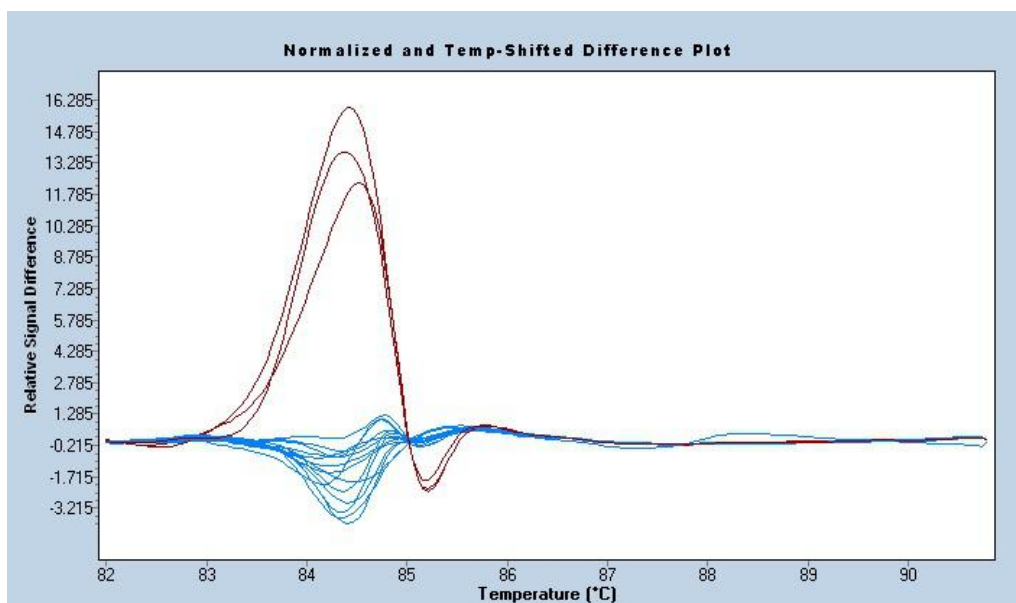


#### a2) Všechny další nalezené intronové varianty v genu *CYP3A5*, exon 2:

Graf zobrazující relativní změnu signálu v závislosti na rostoucí teplotě pro varianty c.75-59C>T, c.75-53T>A, c.75-2A>G v intronu genu *CYP3A5*, Modré křivky reprezentují wild type varianty, červené varianty suspektní.

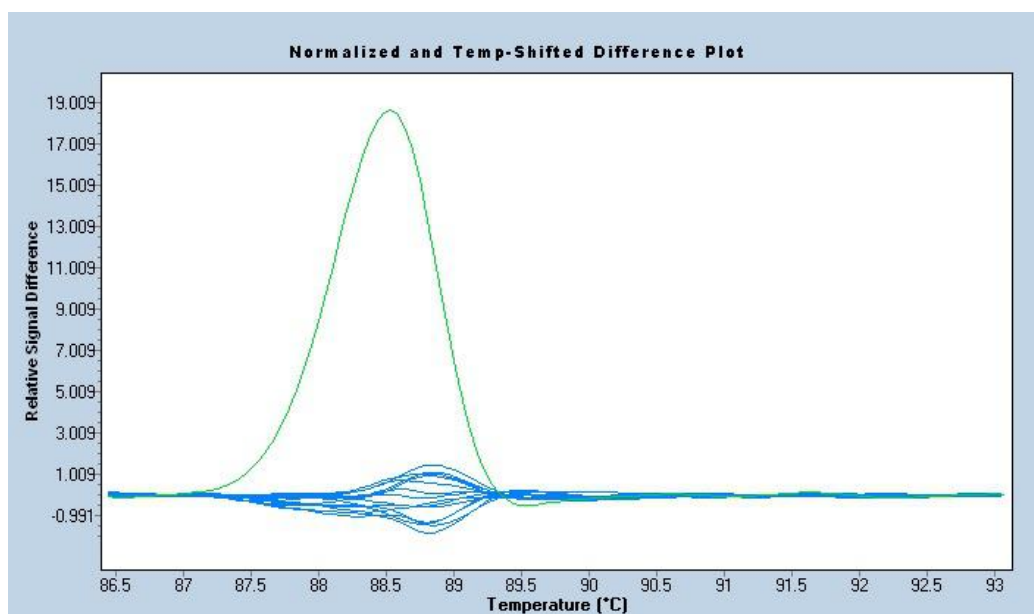
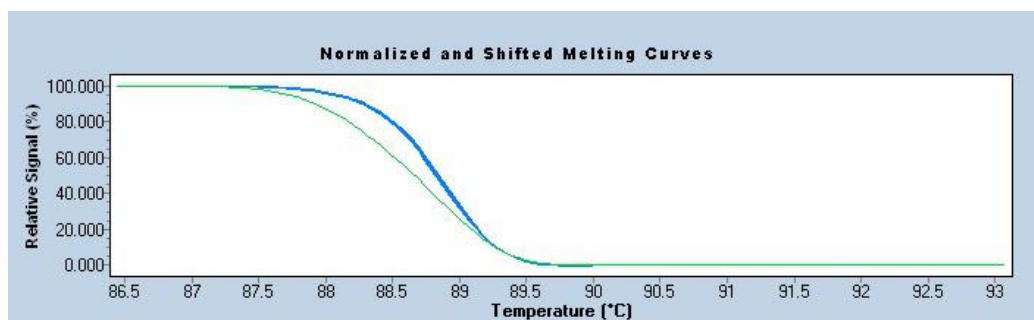






**b1)** Všechny další nalezené varianty v gen *CYP1A2*, exon 2:

Graf zobrazující relativní změnu signálu v závislosti na rostoucí teplotě pro variantu c.831+21G>A v intronu genu *CYP1A2*, Modré křivky reprezentují wild type varianty, zelená variantu suspektní.



Graf zobrazující relativní změnu signálu v závislosti na rostoucí teplotě pro variantu c.831+6C>T v intronu genu *CYP1A2*, Modré křivky reprezentují wild type varianty, fialová variantu suspektní.

